



Perturbations de l'homéostasie lymphocytaire T chez le macaque rhésus chinois en phase aiguë d'infection par le SIVmac251

Rosalie Ponte

► To cite this version:

Rosalie Ponte. Perturbations de l'homéostasie lymphocytaire T chez le macaque rhésus chinois en phase aiguë d'infection par le SIVmac251. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T030 . tel-01085998

HAL Id: tel-01085998

<https://theses.hal.science/tel-01085998>

Submitted on 21 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité Sciences du Vivant / Immunologie

Ecole doctorale Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire
et Infectiologie (Paris)

Présentée par

Rosalie PONTE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

PERTURBATIONS DE L'HOMÉOSTASIE LYMPHOCYTAIRE T

CHEZ LE MACAQUE RHESUS CHINOIS

EN PHASE AIGÜE D'INFECTION PAR LE SIV_{mac251}

soutenue publiquement le 09 Octobre 2014
devant le jury composé de :

Dr Morgane BOMSEL

Pr Jean-Daniel LELIEVRE

Pr Pierre DELOBEL

Dr Françoise BACHELERIE

Dr Emmanuel DONNADIEU

Dr Anne COUEDEL-COURTEILLE

Dr Rémi CHEYNIER

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invité

Directeur de Thèse

*Ai miei genitori,
per i valori che mi hanno trasmesso
e per l'amore che mi hanno sempre dimostrato*

« Everyone you will ever meet knows something you don't. »

- Bill Nye -

Remerciements

Après une première spécialisation en génétique, j'ai décidé de retrouver ma première passion : cette merveille de coordination qu'est le système immunitaire. Je me suis donc engagée dans ce doctorat, heureuse et bien déterminée à résoudre les nombreuses questions que soulevait mon projet. Ce fut une véritable aventure tant professionnelle que personnelle, parsemée de remise en question et de dépassement de soi. Il est certain que le doctorat ne saurait être mené à bien sans un entourage actif et bienveillant. Ces derniers mots s'avèrent finalement les plus difficiles à écrire et j'espère qu'ils seront à la hauteur de ma reconnaissance.

Dans cette dernière ligne droite, je remercie Mesdames et Messieurs les membres du Jury. Je remercie vivement Madame Morgane Bomsel de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je suis très reconnaissante à Monsieur Pierre Delobel et Monsieur Jean-Daniel Lelièvre d'avoir accepté d'examiner ce travail. Toute ma gratitude va également à Madame Françoise Bachelerie pour l'intérêt porté à ces travaux. Je remercie Monsieur Emmanuel Donnadiou pour m'avoir communiqué une vision de la recherche dominée par le partage des connaissances.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse pour m'avoir fait confiance et permis de mener à bien ces travaux au sein de son équipe. J'ai pu poursuivre mon engagement associatif en parallèle de mon travail de doctorat, opportunité qui n'est pas offerte à tous les doctorants.

Je remercie bien évidemment l'ensemble du laboratoire avec qui j'ai partagé cette aventure. Merci à Anne de s'être impliquée dans les demandes de financement nécessaires à la poursuite de ces travaux au cours d'une année supplémentaire.

Maga, tu as été un exemple de rigueur et de persévérance. Par dessus-tout, tu m'as donné un second souffle et conduite vers l'épanouissement intellectuel. Pour l'anecdote, je n'oublierai pas nos microdissections nocturnes entrecoupées de pauses *obscur* dans le sinistre hall de notre cher bâtiment. Merci pour tout ce temps que tu m'as accordé. Et pour tout ce chocolat que tu m'as évité de manger.

Isabelle, merci pour nos conversations authentiques touchant la recherche et la vie. Tu as été une personnalité attachante avec laquelle il fut agréable d'échanger sur des sujets variés.

Béné, merci pour ta bonne humeur permanente. Ta sérénité et ton épanouissement contribuent de façon conséquente à la bonne ambiance du laboratoire. J'ai beaucoup apprécié ces mois d'août en ta compagnie.

Suzanne, cette thèse est aussi la tienne. Ma première année « en solo » m'a donné de quoi estimer ton aide à sa juste valeur. Merci d'avoir répété encore et encore ces mêmes manip, m'autorisant ainsi à m'attaquer à d'autres pistes. Merci d'avoir partagé mes émotions devant le robot 384 en action ! Tu as toujours été à l'écoute dans les échecs comme dans les succès et tu m'as soutenue bien plus que techniquement.

Faten, ton sourire et ta bonne humeur ont été rafraichissants et tu as donné un souffle nouveau au laboratoire.

Quant aux membres passés du labo, je remercie Véro, pour son authenticité, sa justesse et sa force tranquille. Quel regret que tu sois partie si vite! Merci à Véro, Jacques et Béné pour avoir initié ces travaux avant mon arrivée au laboratoire. Véli, blagodaria pour ta complicité et ta jovialité. Ophélie, j'ai vraiment pris plaisir à travailler avec toi et je ne doute pas de ta réussite.

A Sandrine et Amandine je dois le bon déroulement de ce doctorat, qui représente aussi la découverte d'une belle amitié. Sandrine, tu as toujours défendu tes valeurs avec force, j'admire ta justesse et ton franc parler communicatif. Amandine, tu m'as souvent ébahie par ton enthousiasme en toutes circonstances, tu as toujours été disponible avec le sourire et tu as été un modèle de ténacité et de courage.

Je n'imagine pas ces quatre années sans vous, présentes pour partager angoisses comme réussites. La découverte des nombreuses enfractuosités de la recherche scientifique n'a pas été aisée et j'ai été heureuse que nous partagions beaucoup de convictions. Je sors grandie de mon expérience à vos côtés. Alors que la fin de cette histoire approche, je me sens déjà nostalgique de tous ces moments partagés. Merci d'avoir fait abstraction des doubles congos. Je ne partirai pas de ce pays sans un biomoulox enregistré ou sans avoir tourné un clip à l'azote, vous êtes averties.

Nombreux sont ceux qui ont contribué au bon déroulement de mon doctorat sans avoir directement participé à mes travaux. Du 8^e au 3^e étage de l'institut, je remercie chaleureusement Arnaud pour m'avoir offert ses conseils et son écoute bienveillante et tous les « Hosmalins », notamment JP pour sa créativité. J'adresse un « bonjour » à Diane (D'allard et al.) pour ses irrutions souriantes que j'aurai plaisir à retrouver de l'autre côté de l'Atlantique. Merci à Kévin également pour ses conseils précieux durant toute cette dernière année. Je remercie Stéphane et Nico grâce à qui je garde de nombreux souvenirs de l'ambiance cochinoise. Monsieur le Président, Nicolas, tu m'as donné un bol d'air en m'initiant à la découverte de toutes ces compétences acquises au cours de cette véritable expérience professionnelle qu'est le doctorat. Merci à Greg pour son énergie et sa bonne humeur communicatives, toujours les bienvenues. Merci à Sophie A : tu es une personne qui gagne à être connue. Merci à ma partenaire Sophie L. Merci à Céline, Antoine, Cortès et tous les autres. Thomas, ce fut un plaisir de collaborer avec toi, bien cordialement. Merci à Flancia et Sandrine pour avoir toujours été disponibles et agréables. Merci à Jean et Ali pour ces petits riens qui illuminent une journée. Merci à Stan, Gabi et Guillaume pour leur gentillesse. Maryline, ça a été un réel plaisir de passer ces heures au microscope en échangeant avec toi sur des sujets variés. Merci à Mathieu et Chloé pour leur gentillesse. Merci à Colette et Fabio qui contribuent dans l'ombre au bon déroulement de nos recherches.

Je suis reconnaissante à tous les membres passés et présents de JeCCo qui contribuent à réunir et unir les doctorants de l'institut. Merci également à Marie-Ange qui nous aide tous avec ferveur.

J'adresse toute ma sympathie à l'ensemble de l'équipe organisatrice du forum BIOTechno 2014 avec qui mener à bien cet engagement associatif en parallèle de mes travaux de doctorat a été très enrichissant. Merci pour toutes ces portes qui se sont ouvertes sur un monde de possibles !

En dehors de Cochin mais toujours dans la recherche, je pense particulièrement à Marie-Amélie qui a toujours été là dans les moments difficiles. Tu m'as tout simplement rendue meilleure. De San Diego à Marseille, mes pensées vont à Yann pour m'avoir encouragée à sa manière à poursuivre mes études scientifiques en doctorat. Sache qu'au delà de tes qualités de chercheur acharné, ta force et ton charisme m'ont toujours positivement impressionnée.

J'ai bénéficié de l'immense opportunité de participer aux Universités Jeunes Chercheurs organisées par SIDACTION. Destinée à réunir personnes vivant avec le VIH, cliniciens, biologistes et sociologues de tous horizons autour de la lutte contre le VIH/SIDA, cette formation a constitué une inoubliable rencontre humaine et professionnelle. Tous les acteurs de cette semaine formidable ont positivement influencé mon opinion de la recherche sur le VIH, qu'elle soit d'ordre biomédicale ou sociale.

Au tout début de ce long parcours, je pense à Madame Corinne Abbadie et Monsieur Fabien Van Coppenolle qui m'ont permis de découvrir la recherche *in situ* tout en me transmettant leur passion. Aujourd'hui encore, je conserve précieusement la recette du LCR et le tube de tunicamycine.

Merci à l'ensemble de mes amis, si précieux, pour leur présence et leur considération. Vous avez contribué sans conteste à mon équilibre pendant ce doctorat.

Merci à ma famille qui s'est montrée curieuse de mes recherches et qui a toujours été à mes côtés. En particulier, merci à mes parents à qui je dois mon épanouissement aujourd'hui. Si je me prépare à soutenir cette thèse, c'est indéniablement grâce à vous qui m'avez encouragée et soutenue depuis le début. C'est pourquoi ces travaux vous sont dédiés.

Enfin, merci à Christophe qui m'a soutenue jour après jour avec amour. Merci pour ta compréhension et ta patience mais surtout pour ta joie de vivre, source de bonheur et d'inspiration au quotidien !

Résumé

Le macaque rhésus infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) fait l'objet de nombreuses études en tant que modèle de la pathogenèse induite par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Il existe deux sous-espèces de macaque rhésus définies notamment d'après leur origine géographique. Le macaque rhésus indien montre une progression pathologique particulièrement rapide, caractérisée par une déplétion massive de la population lymphocytaire T CD4⁺ intestinale les jours suivant l'infection. Cette déplétion a été associée à la translocation des bactéries commensales à travers l'épithélium intestinal en phase chronique. En revanche, chez le macaque rhésus chinois la vitesse de développement de la maladie est comparable à celle des patients infectés par le VIH-1. En périphérie, les données virales et immunologiques sont également plus proches de ce qui est documenté chez l'Homme infecté. Toutefois, la cinétique de dégradation de la muqueuse intestinale les jours suivant l'infection reste peu explorée dans ce modèle.

Dans un premier temps, mes travaux de doctorat ont permis de confirmer la dissémination rapide du SIV dans le tractus gastro-intestinal du macaque rhésus d'origine chinoise. L'intestin grêle, notamment l'iléon, est la cible d'une réplication virale soutenue et très précoce. Malgré une réplication virale intense, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans la muqueuse de l'iléon reste constant durant les deux premières semaines suivant l'infection par le virus dans ce modèle. Nous observons en revanche une augmentation conséquente du nombre de cellules T cytotoxiques et de macrophages, suggérant la mise en place d'une forte réponse immunitaire *in situ*.

Nous démontrons que l'augmentation du nombre de ces cellules et le maintien du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans la muqueuse iléale sont certainement liés, du moins en partie, au recrutement de cellules circulantes. En effet, nous décrivons pour la première fois une augmentation significative de l'expression de nombreuses chimiokines par cette muqueuse dès les premiers jours suivant l'infection. En parallèle nous décrivons, dans le sang périphérique, une diminution transitoire du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.

Enfin, nous avons décelé une augmentation de l'expression d'interleukine 7 (IL-7) après infection. Cette augmentation, spécifiquement observée dans la muqueuse de l'intestin grêle, est corrélée à l'expression des chimiokines. Ces résultats apportent de nouveaux éléments sur la contribution de l'IL-7 dans la régulation de l'expression des chimiokines par la muqueuse intestinale suite à l'infection par le SIV.

L'ensemble de nos résultats démontre que la population de lymphocytes T CD4⁺ de l'intestin grêle est préservée au cours de l'infection aiguë par le SIV chez le macaque rhésus chinois. En parallèle, l'exacerbation de l'expression locale de chimiokines laisse supposer une relocalisation des cellules du système immunitaire vers la muqueuse intestinale. Ces migrations pourraient avoir des effets délétères pour l'hôte en apportant de nouvelles cibles nourrissant la réplication virale. A l'opposé, le recrutement localisé de cellules immunitaires clés pour le déclenchement des réponses antivirales innées et adaptatives pourrait limiter la réplication du virus. Il est donc crucial de mieux définir l'impact de ce recrutement sur l'immunité muqueuse et la progression de la maladie. Nos découvertes apportent également de nouveaux arguments en faveur de l'utilisation du macaque rhésus d'origine chinoise en tant que modèle de choix pour l'étude de la physiopathologie de l'infection humaine par le VIH-1.

Mots-clés: HIV/SIV, macaque rhésus chinois, infection aiguë, intestin grêle, chimiokines, lymphocytes T, macrophages.

Abstract

As a model to study type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) pathogenesis, rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus (SIV) are under extensive investigation. Two subspecies of rhesus macaques have been defined, based on a different geographic origin. Indian rhesus macaques exhibit a rapid disease progression and acute infection is characterized by a massive CD4 T-cell loss in the intestinal mucosa. This was associated to the translocation of bacterial products through the gut epithelium during the chronic stage. Contrary to the animals of Indian origin, the pathogenesis of Chinese rhesus macaques infected with SIV is similar to HIV-1 infected patients. Viral and immunological settings in periphery are also closer to what is described in infected humans. However, the kinetics of mucosal disruption is poorly documented in this model.

As a first step, I confirmed the rapid SIV dissemination in the gastro-intestinal tract of Chinese rhesus macaques. The small intestine, in particular the ileum, undergoes an early and high viral replication. Despite this high viral load, the numbers of CD4⁺ T cells in the ileum mucosa remains unchanged during the first two weeks following infection in this model. On the other hand, we noticed a substantial augmentation of cytotoxic T-cell numbers and macrophages, suggesting the establishment *in situ* of a strong immune response.

We demonstrated that this augmentation of CD8⁺ T cells and macrophages together with the maintenance of helper T-cell numbers in the ileum mucosa are most probably related, at least in part, to the recruitment of circulating cells. Indeed, we describe for the first time a significant augmentation of numerous chemokine expressions by this mucosa the first days post-infection. At the same time, we described a transient diminution of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell numbers in the blood.

Finally, we detected a significant upregulation of interleukine 7 (IL-7) expression after SIV infection. This increase, specifically observed in the small intestine mucosa, is correlated to chemokine expressions. These results highlight new evidences on IL-7 contribution in the regulation of chemokines expression following SIV infection.

All together, our results revealed the preservation of CD4⁺ T cell population in the small intestine mucosa during the acute phase of SIV infection in Chinese rhesus macaques. Furthermore, the exacerbation of local chemokine expressions let us think that immune cells are relocated to the intestinal mucosa the first days after infection. These migrations could have deleterious effects to the host, bringing new targets for viral replication. On the other side, this localized recruitment of immune cells that are key players in intestinal immunity could restrict the replication of the virus. Consequently, it is of major importance to better define the impact of immune cells trafficking on intestinal mucosa integrity and disease progression. Our findings bring new arguments in favor of Chinese rhesus macaque as a suitable model to study HIV-1 pathogenesis.

Key words: HIV/SIV, Chinese rhesus macaque, acute infection, small intestine, chemokine, T cells, macrophages.

Table des matières

Liste des illustrations et tableaux.....	17
INTRODUCTION GENERALE.....	19
I. LES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE.....	21
A. Un brin d'histoire : débuts de l'épidémie et découverte des VIH.....	21
1. Premiers cas déclarés	21
2. L'épidémie commence.....	21
3. Identification des VIH	21
B. L'épidémie VIH/SIDA aujourd'hui.....	22
1. Dans le monde.....	22
2. En France.....	22
C. Généralités sur les rétrovirus et classification des VIH.....	23
1. Caractéristiques des rétrovirus.....	23
2. Classification des VIH et diversité génétique	24
D. Transmission et répartition géographique des VIH	24
E. Origine des Virus de l'Immunodéficience Humaine.....	25
1. Découverte des virus de l'immunodéficience simienne	25
2. Les SIV à l'origine des VIH : apport des analyses phylogénétiques	26
3. Existe-t-il un risque d'émergence de nouvelles épidémies ?.....	27
F. Utilisation de modèles animaux pour comprendre et lutter contre les VIH.....	28
1. Le modèle murin	28
2. Le modèle félin.....	29
3. Les primates non humains, modèles d'étude de la physiopathologie de l'infection à VIH.....	29
II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 ET APPORT DES MODELES PNH	
POUR L'ETUDE DE L'INFECTION AIGUE	33
A. Tropisme cellulaire	33
1. Récepteurs et co-récepteurs au VIH	33
2. Cellules cibles du VIH-1	36
B. Une pathogenèse en 3 phases.....	41
1. Généralités.....	41
2. Cas particuliers	42
C. Pertinence des modèles PNH pour l'étude de la primo-infection	43
1. Apport des modèles PNH	43
2. Le tractus digestif pour cible	44
III. LYMPHOCYTES T ET MACROPHAGES DE LA MUQUEUSE INTESTINALE SAINNE.....	45
A. Zoom sur la muqueuse intestinale en conditions physiologiques.....	45
1. Généralités sur les muqueuses et les tissus lymphoïdes associés.....	45
2. Structure et fonction du tractus gastro-intestinal.....	46
3. Les compartiments du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)	50
B. Les macrophages et les lymphocytes T de la lamina propria et leur fonction pour le	
maintien de l'homéostasie des muqueuses	51
1. Macrophages résidants dans la lamina propria saine	51
2. Recrutement pathologique de monocytes vers la muqueuse intestinale	52
3. Principes généraux et identification des principales sous-populations de lymphocytes T chez le	
macaque rhésus.....	53
4. Les lymphocytes T du GALT.....	54
C. Recrutement des lymphocytes T à la muqueuse intestinale.....	60
1. Principes généraux.....	60
2. Principales molécules impliquées dans la circulation des lymphocytes T vers la muqueuse	
intestinale	61

D. Sortie des lymphocytes à partir de l'intestin	76
E. Interleukine-7, homing et immunité muqueuse.....	77
1. Développement et homéostasie des lymphocytes T	77
2. Identification des cellules productrices d'IL-7 grâce aux modèles murins	78
3. Récepteur à l'IL-7 et signalisation.....	78
4. IL-7 et immunité muqueuse.....	79
IV. ATTEINTE DE LA MUQUEUSE DIGESTIVE EN PHASE AIGUE D'INFECTION PAR LE SIV	81
A. Déplétion des lymphocytes T CD4 ⁺ intestinaux.....	81
1. Déplétion des lymphocytes T CD4 ⁺ intestinaux chez les patients en SIDA	81
2. Apport du modèle macaque rhésus d'origine indienne pour l'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1	82
3. Déplétion des lymphocytes T muqueux chez les modèles PNH non pathogènes	86
B. Principales conséquences de la déplétion des LPL CD4 ⁺ de la muqueuse intestinale chez le macaque rhésus et l'Homme	87
1. Translocation bactérienne.....	87
2. Activation du système immunitaire	89
C. IL-7 et restauration de la muqueuse intestinale.....	90
D. Le modèle macaque rhésus d'origine chinoise est un modèle de choix pour l'étude de la primo-infection	90
1. Deux sous-espèces de macaque rhésus sont utilisées pour la recherche	90
2. Limitations de l'utilisation du macaque rhésus d'origine indienne pour l'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1	92
3. La pathogenèse induite par SIVmac chez le macaque rhésus d'origine chinoise est plus proche de celle des patients infectés par le HIV-1.....	94
4. Mécanismes limitant la pathogénicité du SIV chez le macaque rhésus chinois	95
PRINCIPAUX OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	97
MATERIEL & METHODES.....	101
I. Animaux, infections et échantillonnage	103
A. Animaux et infections	103
B. Echantillonnage	104
II. Quantification de l'expression des chimiokines et de l'IL-7	104
A. Extraction des ARN totaux à partir des morceaux d'organes.....	104
B. Reverse transcription.....	105
C. PCR nichée.....	105
1. Pré-amplification par PCR	105
2. Quantification en temps réel.....	106
III. Quantification de la réplication virale dans le plasma et le tractus digestif.....	107
A. Quantification de la charge virale plasmatique	107
B. Quantification de l'ADN viral dans les tissus	108
C. Quantification de l'ARN viral SIV dans les tissus.....	109
IV. Hybridation in situ couplée à l'immunomarquage	109
A. Synthèse des sondes spécifiques des ARNm CCL19 et CCL25 de macaque rhésus.....	109
B. Hybridation in situ couplée à l'immunomarquage	110
1. Hybridation in situ	110
2. Marquage immunohistochimique	111
V. Immunomarquage des coupes d'iléons en fluorescence et analyse des images	112
A. Immunomarquage	112
B. Microscopie et post-traitements	113
1. Acquisition des images brutes et reconstitution des mosaïques.....	113
2. Quantification de la surface marquée par surface analysée	114
VI. Analyse des sous-populations lymphocytaires T par cytométrie en flux.....	114

RESULTATS	117
I. Présentation des résultats	119
II. Etude n°1.....	120
A. Introduction à l'étude n°1	120
B. Etude n°1	122
C. Synthèse des résultats.....	163
D. Résultats supplémentaires	167
1. Suivi longitudinal des animaux infectés	167
2. Surface occupée par les lymphocytes T CD4 ⁺ dans l'iléon.....	169
3. L'expression des chimiokines dans les ganglions est modifiée après infection	171
III. Etude n°2.	177
Introduction intermédiaire et synthèse des résultats	177
A. Introduction à la fonction thymique.....	177
1. Anatomie et histologie du thymus.....	177
2. Principales étapes de la thymopoïèse humaine et implication des chimiokines.....	178
B. Les TRECs (« T-cell receptor excision circles »).....	180
C. Etude n°2	181
D. Synthèse des résultats de l'étude n°2	203
1. Mesure des TREC	203
2. Impact de l'infection SIV sur l'expression des chimiokines	204
3. Conséquences de l'infection sur la fonction thymique.....	204
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	205
I. Choix pertinent du modèle expérimental pour l'étude la phase aiguë de l'infection par le SIVmac.....	207
II. Le niveau d'infection du tractus intestinal en phase aiguë est hétérogène	208
III. L'infection aiguë par le SIV induit une lymphopénie périphérique transitoire	213
A. Rôle de la lymphopénie dans la pathogenèse de l'infection.....	213
B. L'infection aiguë par le SIVmac induit une perturbation de la fonction thymique et du trafic lymphocytaire	215
IV. Conséquences de l'infection de l'iléon sur l'expression des chimiokines.....	218
A. Impact de l'infection de la muqueuse	218
B. Impact de l'infection des ganglions sur l'expression des chimiokines	221
V. Préservation du nombre de LPL CD4⁺ dans l'iléon des macaques rhésus chinois en phase aiguë d'infection par le SIVmac	223
VI. Accumulation des macrophages dans la muqueuse pendant la phase aiguë de l'infection SIV	228
VII. Fluctuations de la population CD4⁺ CD3⁻ intestinale	229
VIII. Conséquences de l'infection sur l'expression de l'IL-7	230
CONCLUSION GENERALE	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237

Liste des illustrations et tableaux

Figure 1 : Estimation du nombre d'adultes et enfants nouvellement infectés par le VIH en 2012.	23
Figure 2 : Classification de l'ordre des Primates, divisé entre les Prosimiens et les Anthropoïdes.	26
Figure 3: Arbre phylogénétique illustrant l'histoire évolutive des lignées de SIV et VIH.	27
Figure 4 : Modèle général des trois phases cliniques de l'infection par le VIH-1.	43
Figure 5: Distribution anatomique des surfaces muqueuses le long du tractus digestif.	47
Figure 6 : Structure histologique de l'intestin grêle.	48
Figure 7 : Les différents degrés de repliement de l'intestin grêle.	49
Figure 8 : Représentation schématisée des compartiments du GALT.	50
Figure 9 : Identification des cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ naïves, centrales mémoire et effectrices mémoires dans la circulation des macaques rhésus par cytométrie de flux.	54
Figure 10 : Immunohistofluorescence sur coupe d'intestin grêle humain (duodénum).	55
Figure 11 : Schéma général de l'évolution des propriétés migratoires des lymphocytes T.	60
Figure 12 : Principales étapes de la cascade d'adhésion.	62
Figure 13 : Chimioquinas et récepteurs spécifiques	67
Figure 14 : Les principaux systèmes de contrôle de l'activité des chimioquinas.	70
Figure 15 : Chimioquinas produites constitutivement par les cellules épithéliales de l'intestin grêle et leur récepteur en surface des lymphocytes T de la lamina propria.	74
Figure 16 : Principales cascades de signalisation déclenchées par la fixation de l'IL-7 sur son récepteur en surface des lymphocytes T naïfs.	79
Figure 17 : Mesure de la concentration en LPS plasmatique chez des patients sains et à différents temps post-infection par le VIH-1.	88
Figure 18 : Modèles pathogènes et non pathogènes de l'infection par le SIV.	89
Figure 19 : Localisation géographique de l'espèce macaque rhésus.	91
Figure 20 : Comparaison de la charge virale SIV et VIH-1 plasmatique.	93
Figure 21 : Charge virale plasmatique au cours de l'infection SIV aiguë.	167
Figure 22 : Nombres de lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ circulants au cours de l'infection aiguë.	168
Figure 23 : Surface occupée par le comarquage CD3 ⁺ CD4 ⁺ dans la lamina propria par animal.	169
Figure 24 : Estimation du nombre de cellules marquées	170
Figure 25 : Expression des chimioquinas dans les ganglions de macaques rhésus sains.	171
Figure 26 : Quantification de l'ARNm codant pour CXCL10 et CCL5 dans les ganglions axillaires au cours de la phase aiguë de l'infection SIV.	173
Figure 27 : Quantification de l'ARNm codant CXCL10, CCL5 et CCL20	174
Figure 28 : Quantification de l'expression de l'IL-7 dans les ganglions axillaires, mésentériques et l'iléon des animaux sains	175
Figure 29 : Histologie et organisation du thymus humain.	177
Figure 30 : Les différentes étapes de la thymopoïèse humaine	178
Tableau 1 : Liste des chimioquinas détectées dans l'intestin grêle chez l'Homme et la souris et impliquées dans le recrutement des lymphocytes T.	75
Tableau 2	84
Tableau 3 : Paramètres viraux et immunologiques recueillis chez les deux sous-espèces de macaques rhésus et les patients infectés par le VIH-1	95
Tableau 4 : Séquences des amorces externes (« out ») et internes (« in ») utilisées pour la quantification des ARNm codant les chimioquinas et l'IL-7 par PCR nichée	107
Tableau 5 : amorces utilisées pour la quantification de l'ADN et l'ARN viral	109
Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés pour l'immunomarquage des coupes d'iléons	112
Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour l'immunomarquage des coupes d'iléons	113
Tableau 8 : Anticorps utilisés pour l'analyse des sous-populations lymphocytaires T chez le macaque rhésus chinois	115

z

INTRODUCTION GENERALE

I. LES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE

A. Un brin d'histoire : débuts de l'épidémie et découverte des VIH

1. Premiers cas déclarés

Fin **1979** à Los Angeles, un médecin remarque chez un patient une augmentation de la taille de ses ganglions associée à de fortes fièvres. A ce tableau clinique s'ajoutait une infection opportuniste rare, la pneumocystose causée par *Pneumocystis carinii* et une diminution des lymphocytes T CD4⁺ dans le sang. Plus tard à New-York des cas de Sarcome de Kaposi, un cancer de la peau touchant habituellement les sujets âgés, et d'autres cas de pneumocystose sont diagnostiqués là encore chez des patients immunodéprimés. En **1981** le CDC (« Center for Disease Control ») alerte la communauté médicale et scientifique au sujet du Syndrome d'Immunodéficience Acquise ou SIDA. On parle alors du « Gay Cancer » et sa transmission sexuelle est déjà suspectée.

Des analyses rétrospectives sur des échantillons de sang conservés pendant plus de 20 ans indiqueraient que le VIH était présent au Congo dans les années 1950/1960. Cependant, les raisons pour lesquelles l'épidémie n'a émergé que 10 ans plus tard aux Etats-Unis restent soumises à controverse.

2. L'épidémie commence

De nombreux diagnostics rétrospectifs ont lieu dans le monde et les 200 cas de SIDA sont franchis en **1982**. Fin 1982, la contamination des hémophiles confirme que la maladie est d'origine virale et que sa transmission a lieu par voie sanguine également. En **1984** on dénombre 12 000 cas. Dix ans plus tard, plus de 300 000 cas de SIDA sont rapportés au CDC aux Etats-Unis.

3. Identification des VIH

A l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, en janvier **1983**, un ganglion cervical est excisé chez un homme de 33 ans qui présentait une lymphadénopathie laissant suspecter le SIDA. Le prélèvement est mis en culture à l'institut Pasteur et permet la détection d'une activité transcriptase inverse, mettant les chercheurs sur la piste d'un rétrovirus. Quelques mois plus tard, un rétrovirus infectant les lymphocytes T CD4⁺ est isolé (Barré-Sinoussi et al., 1983). Plus tard, il sera renommé VIH pour Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Un second virus apparenté est découvert en **1986** chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest également atteints de SIDA (Clavel et al., 1986). Génétiquement distinct du premier virus, il est nommé VIH-2.

L'identification des VIH aurait pu être considérablement retardée sans la découverte du premier rétrovirus humain HTLV-1 aux Etats-Unis (Poiesz et al., 1980); (Lever & Berkhout, 2008).

B. L'épidémie VIH/SIDA aujourd'hui

1. Dans le monde

Depuis l'annonce des premiers cas de SIDA il y a trente-quatre ans, avec plus de 36 millions de décès recensés jusqu'à ce jour et presque autant de personnes vivant avec le VIH, l'épidémie SIDA continue d'être un problème majeur de santé publique. D'après le rapport ONUSIDA de 2012, les nouvelles contaminations ont baissé de 20% depuis 2001 mais restent alarmantes spécialement en Afrique Sub-Saharienne (**Figure 1**) et chez les jeunes (15 à 24 ans).

Malgré un élargissement considérable de l'utilisation des traitements, fruit de l'engagement politique et de la mobilisation des communautés, plus de 10 millions de patients n'y ont toujours pas accès. Cependant, la Recherche se veut porteuse d'espoir avec la mise en place du groupe de travail international « Towards an HIV cure » qui définit les priorités pour aller vers une rémission de la maladie. La recherche fondamentale s'y inscrit notamment pour permettre une meilleure compréhension des événements précoces de la mise en place du réservoir viral et son éradication.

2. En France

Le nombre de séropositifs en France est estimé à 150 000 personnes en 2013, dont 6000 nouveaux cas chaque année. Les départements d'Outre-Mer sont les plus concernés par les nouvelles contaminations. De façon alarmante, chez les jeunes français (18-29 ans) apparaît une banalisation de la maladie accompagnée d'une diminution flagrante de leurs connaissances en matière de prévention : en 2010 ils sont moins nombreux qu'en 1992 à considérer le préservatif comme « tout à fait efficace » pour se protéger de l'infection (source : enquête KABP « knowledge, attitudes, beliefs and practices »).

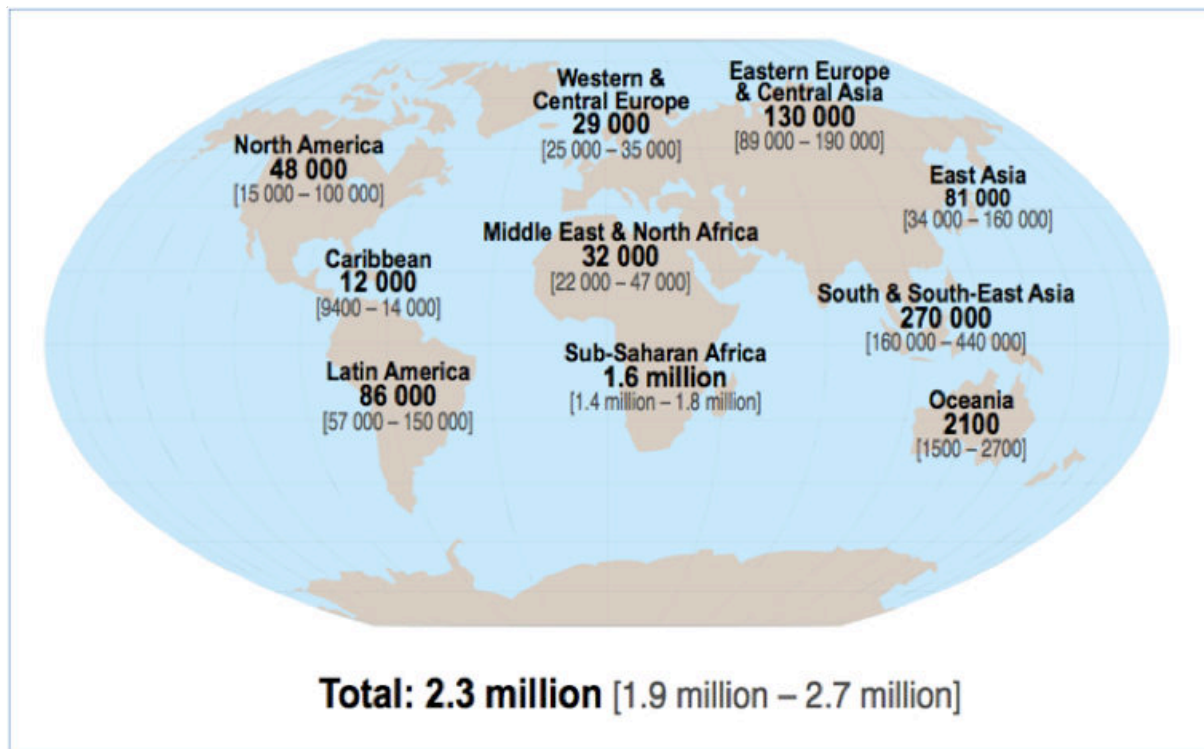


Figure 1 : Estimation du nombre d'adultes et enfants nouvellement infectés par le VIH en 2012.
(source : UNAIDS global report 2013)

C. Généralités sur les rétrovirus et classification des VIH

1. Caractéristiques des rétrovirus

Les rétrovirus appartiennent à la famille des Retroviridae et sont très répandus dans le monde animal. Tous les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le génome à ARN positif est sous forme monocaténaire diploïde, où chaque brin possède une taille de 7 à 12 000 nucléotides en moyenne. Leur caractéristique principale est la rétro-transcription de la séquence ARN virale en un ADN complémentaire grâce à la transcriptase inverse puis l'intégration de cet ADN dans le génome de la cellule infectée grâce à une autre protéine clé, l'intégrase. Après intégration, le virus peut s'exprimer pour produire de nouvelles particules virales. Mais il peut également rester dans la cellule à l'état latent, invisible à la détection par le système immunitaire, pour constituer ainsi un réservoir viral.

a. Rétrovirus endogènes

Le séquençage du génome humain a permis de trouver de très nombreuses séquences de rétrovirus, dits endogènes, sans conséquence pathogène pour l'organisme. Ils constitueraient jusqu'à 8% de notre génome (Griffiths, 2001). Nous considérons aujourd'hui qu'ils ont joué un rôle déterminant dans l'évolution des espèces et notamment de la branche des primates (Yohn et al., 2005).

b. Rétrovirus exogènes

Les rétrovirus exogènes ne sont pas présents naturellement dans l'organisme hôte. Les rétrovirus infectieux des vertébrés sont regroupés en 7 genres dont deux sont reconnus comme étant pathogènes chez l'Homme : les deltaretrovirus (HTLV pour « Human T-cell Leukemia Virus ») et les lentivirus (VIH).

2. Classification des VIH et diversité génétique

Le VIH fait partie de la sous-famille des Orthoretrovirinae et appartient au genre des lentivirus, c'est à dire que la pathologie qu'il induit se caractérise par une évolution graduelle et une réplication virale persistante pendant plusieurs années avant d'induire une pathologie déclarée. Le VIH-1 et le VIH-2 sont tous deux caractérisés par une diversité génétique considérable et plusieurs groupes ont pu être définis sur la base d'analyses phylogénétiques. Ainsi, il existe huit groupes de VIH-2 (de A à H) et quatre groupes distincts de VIH-1 : M, N, O et P, ce dernier ayant été découvert plus récemment (Plantier et al., 2009). Le groupe M (« main ») est retrouvé à plus de 90% chez les patients infectés ; il est lui-même subdivisé en 9 sous-types. A ces sous-types s'ajoutent encore des formes recombinantes issues de la co-infection de patients par des sous-types différents.

D. Transmission et répartition géographique des VIH

Les VIH se transmettent par voie sexuelle, sanguine et materno-fœtale, lors de l'accouchement et de l'allaitement. La transmission du VIH-1 par voie sexuelle est majoritaire à l'échelle mondiale. En l'absence de traitement, le risque de transmission mère-enfant (TME) a été évalué à 15-30% pendant la grossesse et l'accouchement et à 10-20% durant l'allaitement (Toure, Nkurunziza, Sagoe-Moses, G, & T, 2013).

Le VIH-1 est la cause de la pandémie actuelle alors que VIH-2, moins transmissible, montre une répartition géographique restreinte à l'Afrique de l'Ouest, avec cependant une augmentation du nombre de cas en Europe, en Inde et aux Etats-Unis (Campbell-Yesufu & Gandhi, 2011).

E. Origine des Virus de l'Immunodéficience Humaine

1. Découverte des virus de l'immunodéficience simienne

Peu de temps après la découverte du VIH, son équivalent simien a été identifié chez un macaque rhésus (*Macaca mulatta*) en captivité qui présentaient des symptômes similaires à ceux que l'on observe chez l'Homme au stade SIDA. La souche de virus a donc été nommée SIVmac. (Daniel et al., 1985). Cependant, aucune étude n'a permis de mettre en évidence d'infection SIV de macaques dans leur habitat naturel alors que le mangabey enfumé a été montré plus tard comme étant infecté par un virus SIV à l'état naturel. La parenté génétique de ces virus a finalement permis d'attribuer l'infection du premier macaque rhésus à la transmission du SIV d'un mangabey enfumé, infecté naturellement, dans les animaleries américaines. Ainsi, le changement d'hôte a induit une pathologie proche du SIDA chez le macaque. Cet événement fortuit donna naissance au modèle pathogène expérimental de l'infection à VIH (voir chapitre F.3.b).

Depuis, d'autres souches de SIV ont été isolées à partir de plus de 45 espèces de primates naturellement infectés en Afrique, appartenant à la famille des Cercopithecoïdes et des Hominoïdes (Figure 2). Généralement, une souche est spécifique d'une espèce et désignée à l'aide d'un code de trois lettres faisant référence au nom commun en anglais de leur espèce d'origine (par exemple SIVcpz pour « chimpanzee »).

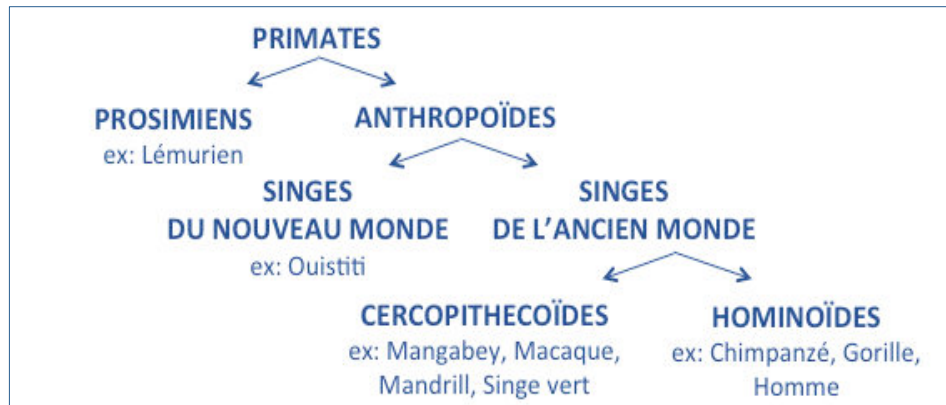


Figure 2 : Classification de l'ordre des Primates, divisé entre les Prosimiens et les Anthropoïdes.
 A ce jour, aucun SIV n'a pu être isolé chez les singes d'Asie ou du nouveau monde. A l'exception du chimpanzé (*Pan troglodytes*), du gorille de l'Ouest (*Gorilla gorilla*) et de l'Homme, tous les primates infectés sont des singes de l'ancien monde appartenant à la famille des Cercopithecoïdes.

2. Les SIV à l'origine des VIH : apport des analyses phylogénétiques

La première souche de SIVcpz a été isolée en 1989 à partir d'un chimpanzé captif né au Gabon (Peeters et al., 1989). Les analyses phylogénétiques ont montré une proximité très étroite avec le VIH-1 (Huet, Cheynier, Meyerhans, Roelants, & Wain-Hobson, 1990) et **Figure 3**). Dès lors, la transmission inter-espèce de SIVcpz à l'Homme comme origine du VIH-1 a été suspectée. La mise au point de méthodes non invasives de séquençage à partir des fèces d'animaux sauvages a permis de renforcer les données phylogénétiques et épidémiologiques (Santiago et al., 2003). Ainsi, chaque groupe de VIH est le résultat d'une transmission inter-espèce du singe à l'homme. Il est maintenant bien établi que les chimpanzés *P. t. troglodytes* sont le réservoir des groupes M et N du HIV-1 (Keele et al., 2006). Les groupes O et P seraient peut-être le résultat de la transmission du SIVcpz au gorille (SIVgor) puis à l'Homme mais leur origine exacte reste à définir (Takehisa et al., 2009), (Neel et al., 2010).

Le VIH-2 présente une organisation génétique plus proche de celle du SIVsm infectant le mangabey enfumé, où un gène présent chez le VIH-1 (*vpu*), est absent et remplacé par un autre gène (*vpx*). Réparti sur les mêmes aires géographiques, la transmission à l'Homme du SIVsm serait donc à l'origine du VIH-2 (Hirsch, Olmsted, Murphey-Corb, Purcell, & Johnson, 1989) (Gao et al., 1992).

En Afrique centrale, les grands singes sont encore chassés pour être consommés ou domestiqués. Or, la chasse et la consommation de viande de singe sont des pratiques très anciennes. Pourtant, les plus anciens cas de SIDA répertoriés en Afrique sont récents puisqu'ils datent de la seconde moitié du 20^e siècle, supportant la théorie actuelle selon laquelle d'autres facteurs sont récemment intervenus en faveur de la dissémination des SIV et l'émergence du VIH. Ces facteurs incluent la déforestation qui ouvre l'accès à des zones jusque-là préservées, l'accroissement de l'urbanisation, des réseaux de communication et des voyages et peut-être une augmentation de l'utilisation de drogues injectables et des transfusions. Ainsi, multipliant les contaminations, des événements de recombinaison auraient permis l'adaptation du virus à l'Homme. Cependant, il faut noter que seulement 4 transmissions inter-espèces ont connu un succès épidémiologique (HIV-1 groupes M et O et HIV-2 groupe A et B). Il n'existe à ce jour aucune réponse définitive quant aux causes faisant d'un virus d'origine animale, globalement non pathogène chez son hôte naturel, une épidémie mortelle pour l'Homme.

F. Utilisation de modèles animaux pour comprendre et lutter contre les VIH

L'absence de modèle animal d'une maladie représente un handicap évident dans la compréhension de sa physiopathologie et les essais thérapeutiques. C'est pourquoi de nombreuses tentatives sont toujours entreprises pour développer un modèle accessible à l'étude de l'infection par le VIH-1.

1. Le modèle murin

Dès les années 1990, les premiers rats et souris humanisés ont permis d'avancer dans la compréhension de l'entrée du VIH dans les tissus malgré l'absence de réplication virale. En plus du fait que ce modèle emploie le VIH lui-même, l'utilisation des souris pour la recherche est portée par l'avantage majeur d'un coût moindre en plus d'une grande facilité d'accès. De nouvelles approches continuent donc d'être tentées pour la mise en place d'un modèle abordable d'étude pré-clinique, modèle qui s'avère précieux pour tester de nouveaux antirétroviraux et des candidats vaccins.

C'est le cas notamment de la souris BLT (« Bone marrow-Liver-Thymus ») qui a reçu des greffes de moelle osseuse, de foie fœtal et de thymus d'origine humaine. Infectables par le VIH-1, les souris BLT montent une réponse immune cellulaire et adaptative spécifique au virus (Brainard et al., 2009). Des nouvelles lignées très attendues de souris BLT « germ-free » sont en développement afin d'explorer le rôle du microbiote dans la pathologie (Nochi, Denton, Wahl, & Garcia, 2013).

2. Le modèle félin

Le chat naturellement infecté par le FIV (« Feline Immunodeficiency Virus ») développe des symptômes types d'immunodépression et la pathogénèse associée ressemble fortement à la pathogénèse induite par le VIH-1 (Bienzle, 2014). Mais des différences majeures notamment au niveau des récepteurs au FIV en surface des lymphocytes T CD4⁺ cibles du virus en font un modèle moins fidèle que les primates non humains (de Parseval, Chatterji, Sun, & Elder, 2004). De nos jours, il est tout de même utilisé à faible échelle pour mieux comprendre les mécanismes de latence virale ou bien encore explorer le rôle des facteurs de restriction cellulaires (pour revue, (McDonnell, Sparger, & Murphy, 2013)).

3. Les primates non humains, modèles d'étude de la physiopathologie de l'infection à VIH

Dans l'espoir de mimer la physiopathologie de la maladie humaine, les deux types de VIH ont été inoculés chez des primates non humains (PNH). Seul le chimpanzé s'est révélé infectable par le VIH-1. Il a donc vite fait l'objet de quelques études mais seuls de très rares cas de SIDA ont été dénombrés, prouvant encore la spécificité et l'adaptation du VIH pour l'espèce humaine (Fultz et al., 1986), (Rutjens et al., 2003). De plus, son appartenance à une espèce en voie de disparition rend bien évidemment le chimpanzé quasi-inutilisable en tant que modèle animal. De même, l'infection de plusieurs espèces de macaques, tels que le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le macaque crabier ou cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) ou bien encore une espèce de babouins (*Papio hamadryas*), par le VIH-2 n'a pas non plus mimé avec succès les événements virologiques et immunologiques connus chez l'Homme et n'a conduit que rarement à l'établissement du SIDA.

Bien que SIV et VIH soient phylogénétiquement proches, les protéines des virus simiens et humains diffèrent en terme de séquence et de structure. Pour mieux comprendre l'impact des traitements sur les protéines virales du VIH-1, les SHIV (« Simian-Human Immunodeficiency Virus »), des virus chimères comprenant à la fois des séquences simiennes et humaines, ont été construits dès le milieu des années 90. Toutefois, ces virus recombinants ont provoqué des effets biologiques divers chez les animaux infectés et par conséquent ne représentent pas un bon modèle pour l'étude de la physiopathologie de l'infection (Nishimura et al., 2004). Récemment, l'équipe du professeur Bieniasz a construit un variant mineur de VIH-1 et a infecté avec succès des macaques à queue de cochon. Le début de l'infection par le virus s'est révélé similaire à ce qui est connu chez l'Homme infecté par le VIH-1. De façon décevante mais également très intéressante, tous les singes ainsi infectés ont fini par contrôler l'infection et aucun n'a développé de SIDA, mimant une catégorie de patients appelés « élites contrôleurs » (Hatzioannou et al., 2009).

Même s'il n'existe toujours pas de modèle animal idéal, de nombreuses informations sur la physiopathologie de l'infection ont été obtenues grâce à l'utilisation des PNH et en particulier des macaques asiatiques et certaines espèces africaines.

a. Les singes d'Afrique : modèles simiens d'infection non pathogène

Alors que le VIH-1 et le VIH-2 sont pathogènes chez l'Homme, de façon générale les SIV n'induisent pas de SIDA chez leurs hôtes naturellement infectés en Afrique malgré une charge virale importante dans les organes lymphoïdes, y compris l'intestin (Diop et al., 2000); (Pandrea et al., 2003); (Gueye et al., 2004). Ceci suggère qu'une longue coévolution entre les virus SIV et leurs hôtes naturels, probablement depuis des milliers d'années, a permis la mise en place de mécanismes pour tolérer l'infection (Worobey et al., 2010). C'est pourquoi les PNH africains représentent un modèle d'étude privilégié des mécanismes ainsi sélectionnés associés à l'absence de pathogénicité du virus et qui constituent encore aujourd'hui une fascinante énigme.

b. Les modèles simiens d'infection pathogène

Les macaques asiatiques ne sont pas porteurs à l'état naturel des SIV mais la transmission accidentelle ou expérimentale du SIVsmm à ces macaques asiatiques aboutit à des formes pathogènes de l'infection SIV. Le macaque rhésus, le macaque cynomolgus et le macaque à queue de cochon sont ainsi devenus les PNH les plus utilisées pour la recherche.

Les macaques asiatiques sont infectables par des isolats SIVmac (Daniel et al., 1987), (Kuller et al., 1990), non seulement par voie intraveineuse mais aussi par voie muqueuse (voie vaginale (Miller et al., 1989), (Sodora, Lee, Dailey, & Marx, 1998b), (Sodora, Gettie, Miller, & Marx, 1998a)) et rectale ((Pauza et al., 1993)). Comme pour le VIH, l'infection par SIVmac peut également être transmise verticalement pendant la vie intra-utérine ((Fazely et al., 1993)) et la transmission de la mère au nouveau-né via l'allaitement a également été prouvée (Amedee, Lacour, & Ratterree, 2003) (Rychert, Lacour, & Amedee, 2006).

Le macaque rhésus infecté par le SIVmac est le modèle le plus largement répandu pour l'étude de la transmission et de la pathogenèse de l'infection par le VIH-1. Nous verrons dans la partie IV.D que la cinétique de progression de la pathologie induite par le SIV montre des différences notables selon les sous-espèces de macaques rhésus considérées. Toutefois, ce modèle récapitule les caractéristiques essentielles de l'infection par le virus humain : tropisme cellulaire, mise en place d'un réservoir viral et progression de la pathologie en trois étapes.

II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 ET APPORT DES MODELES PNH POUR L'ETUDE DE L'INFECTION AIGUE

A. Tropisme cellulaire

Comme tous les virus, les virus de l'immunodéficience dépendent de la présence de protéines cellulaires adéquates et de machineries cellulaires actives pour leur réplication. Le tropisme cellulaire des virus est défini par leur capacité à pénétrer dans des types précis de cellules. Celui-ci est déterminé par l'expression de molécules spécifiques en surface des cellules cibles qui interagissent avec les glycoprotéines de l'enveloppe virale et servent donc de récepteurs.

1. Récepteurs et co-récepteurs au VIH

a. Récepteur

La molécule CD4 est le récepteur principal des VIH (et des SIV). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. En surface des lymphocytes T, le rôle physiologique de CD4 est de lier la molécule du CMH de classe II (CMH II) au cours de la reconnaissance du complexe peptide antigénique-CMH II par les récepteurs des lymphocytes T (TCR pour « T cell receptor »), ce qui a pour conséquence d'amplifier le signal d'activation de la cellule T généré par cette reconnaissance spécifique (Collins et al., 1992). Le virus pénètre dans ses cellules cibles grâce à un complexe de deux glycoprotéines associées de manière non covalente dans son enveloppe : la gp120 et la gp41 (gp pour glycoprotéine). La gp120 de ce complexe fixe CD4 avec une forte affinité (Dalglish et al., 1984), (Klatzmann et al., 1984).

Néanmoins, l'interaction CD4-gp120 n'est pas suffisante pour conduire à l'infection qui nécessite la liaison du virus avec un corécepteur exprimé à la membrane de la cellule hôte (R. D. Harrington & Geballe, 1993).

b. Corécepteurs

Plusieurs molécules ont été décrites comme pouvant servir de corécepteur au VIH-1, ce sont majoritairement des récepteurs aux chimiokines. Les premiers corécepteurs décrits qui sont également les plus importants sont CCR5 (« chemokine C-C motif receptor 5 » ou CD195) (Dragic et al., 1996) et CXCR4 (« chemokine C-X-C motif receptor 4 » ou CD184) (Feng, Broder, Kennedy, & Berger, 1996). Après la fixation de gp120 au récepteur et corécepteur, la gp41 stimule la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule hôte et autorise ainsi l'entrée du génome et des protéines virales dans le cytoplasme de celle-ci.

Selon le corécepteur utilisé par les isolats de VIH-1 pour pénétrer dans leur cellule cible *in vitro*, des variants ont été définis : les souches utilisant CXCR4 comme corécepteur sont nommées «X4» alors que celles qui utilisent CCR5 sont désignées «R5» ; les isolats capables de se servir des deux récepteurs aux chimiokines sont dits «R5X4». Les virus X4 sont également appelés «T-tropiques », CXCR4 étant le corécepteur utilisé par le VIH pour entrer dans les cellules de la lignée lymphocytaire T. Les virus R5 sont appelés « M-tropiques » puisqu'ils infectent principalement les monocytes et les macrophages, mais aussi les lymphocytes T primaires (Berger et al., 1998).

Les souches R5 seraient transmises plus facilement que les souches X4 lors d'infections par voie muqueuse (Pope & Haase, 2003) et sont retrouvées préférentiellement pendant les phases précoces de la pathologie. En revanche, les souches X4 sont détectées plus tardivement dans l'évolution de la pathogénèse et sont associées à une progression rapide vers le SIDA (Schuitemaker et al., 1992).

La découverte d'un petit groupe d'individus à haut risque d'infection mais demeurant séronégatifs a permis la caractérisation d'une mutation ($ccr5\Delta32$) qui aboutit à la traduction d'une protéine CCR5 tronquée non fonctionnelle. La fréquence génétique de cette mutation $ccr5\Delta32$ est de l'ordre de 1% à l'état homozygote dans la population caucasienne (Zimmerman et al., 1997). Cette découverte a ouvert la voie à des thérapies basées sur l'inhibition de la fixation du virus à CCR5 (Dragic et al., 1996), (Y. Huang et al., 1996) (Dean et al., 1996), (Samson et al., 1996). Actuellement cinq molécules inhibitrices, les « virocs », sont à l'essai tandis qu'une seule (le maraviroc) est commercialisée (revues par (Bachelier et al., 2013)).

Chez la souris humanisée infectée par le VIH-1, l'invalidation *in vivo* de la séquence ADN codant pour CXCR4 a permis de conférer une protection significative contre l'infection (Wilén et al., 2011). Malheureusement, cette protection disparaît avec le temps, parallèlement à l'apparition de mutations dans le gène d'enveloppe (*env*) du virus évoquant un switch vers l'utilisation de CCR5. D'après ces résultats, il semble donc nécessaire pour bloquer l'infection de cibler les deux corécepteurs à la fois. Cette stratégie semble en effet prometteuse *in vitro* (Princen et al., 2004). Malgré cette note optimiste, notons que la perturbation du rôle physiologique de ces deux récepteurs aux chimiokines ne sera probablement pas sans conséquence pour l'organisme. De plus, il n'est pas exclu que le virus se serve d'autres corécepteurs pour continuer à infecter des cellules (voir le sous-chapitre ci-après).

Quelques isolats de SIV utilisent CXCR4 (SIV_{agm} : (Schols & De Clercq, 1998), SIV_{mnd} : (Pandrea et al., 2005), SIV_{sm} : (Lauren, 2006) et la majorité des SIV seraient R5-tropiques. De nombreux autres récepteurs de chimiokines peuvent être utilisés par les SIV comme par les VIH. Ce serait le cas par exemple de CCR6 décrit récemment *in vitro* (Islam et al., 2013).

c. Autres protéines facilitant l'entrée du virus dans les cellules

L'accès du VIH-1 aux corécepteurs peut également être facilité par d'autres molécules de surface dont les principales sont CD209/DC-SIGN (« Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non integrin ») exprimée en surface des cellules dendritiques (chapitre 2.c) ou encore l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée à haut niveau en surface des lymphocytes T activés dans la muqueuse intestinale chez l'Homme et les PNH.

En surface des cellules dendritiques, DC-SIGN se lie à la protéine d'enveloppe gp120 (Geijtenbeek et al., 2000) pour induire l'internalisation rapide du virus infectieux dans des compartiments intracellulaires (Kwon, Gregorio, Bitton, Hendrickson, & Littman, 2002). Dans le colon, des cellules « macrophages-like » exprimant CD68 et CD163 ainsi que DC-SIGN ont été observés tout récemment. Ces CPA pourraient jouer un rôle dans la transmission du VIH-1 via la muqueuse colorectale (Preza et al., 2014).

En surface des lymphocytes T, l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ serait plus visible que CD4 pour engager un premier contact avec la protéine d'enveloppe gp120. La liaison gp120- $\alpha 4\beta 7$ ne semble pas nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule mais faciliterait l'interaction du virus avec son récepteur CD4 pour favoriser le processus de fusion de l'enveloppe médié par la glycoprotéine gp41 (Arthos et al., 2008), (Cicala et al., 2009).

2. Cellules cibles du VIH-1

Les lymphocytes T CD4⁺ activés et les macrophages sont les deux principaux types cellulaires contribuant à la réplication du VIH-1 *in vivo*.

a. Lymphocytes T CD4⁺

CXCR4 est constitutivement exprimé par tous les types lymphocytes T, des thymocytes aux lymphocytes T naïfs et mémoires alors que le corécepteur CCR5 est exprimé uniquement par les cellules activées effectrices (Moser, Wolf, Walz, & Loetscher, 2004). Nous verrons en détail (dans la partie III.C.2.b) l'implication des couples récepteurs/chimiokines dans la circulation des lymphocytes T activés, en particulier vers la muqueuse intestinale.

Les lymphocytes T naïfs, qui n'ont pas rencontré leur antigène, sont des petites cellules à la chromatine nucléaire condensée. A l'opposé, après activation, les cellules T deviennent transcriptionnellement actives, ce qui autorise la transcription du virus intégré via la machinerie cellulaire. Les VIH-1 et les SIV se répliquent donc très efficacement dans les cellules T CD4⁺ activées (Nabel & Baltimore, 1987), (van Noesel et al., 1990), (Schnittman et al., 1990).

Ces cellules infectées contribuent en grande proportion à la réplication et la production virale. En effet, la plupart des virions dans le plasma des patients infectés proviennent des cellules T CD4⁺ activées et la durée de vie de ces cellules infectées par le VIH-1 est limitée à une semaine (D. D. Ho et al., 1995). Les lymphocytes T CD4⁺ activés CD4⁺ CCR5⁺ sont particulièrement abondants dans la muqueuse intestinale, au carrefour entre antigènes alimentaires et bactéries commensales (Veazey et al., 2000). Nous reviendrons sur les sous-populations de lymphocytes T intestinaux particulièrement importants pour le maintien de l'immunité muqueuse.

Les conditions optimales de réplication du virus dans les lymphocytes T CD4⁺ activés aboutissent *in vitro* à la lyse de la cellule infectée. *In vivo*, les mécanismes de destruction des ces cellules ne sont pas encore clairs et plusieurs hypothèses sont envisageables: i) la lyse directe des cellules infectées via les effets cytotoxiques du virus, ii) la lyse des lymphocytes T CD4⁺ par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, iii) l'apoptose médiée par des facteurs environnementaux ou bien encore iv) l'hyperstimulation des lymphocytes T CD4⁺ conduisant à l'anergie cellulaire (Rowland-Jones, 2001).

Chez l'Homme et le macaque rhésus infecté par SIVmac, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont dix fois moins infectés que les cellules mémoires dans le sang (Fabre-Mersseman et al., 2011), (Mannioui et al., 2009). L'infection de ces cellules naïves serait souvent abortive car elle ne permet pas un cycle viral complet *in vitro*. Toutefois, *in vivo*, ces données semblent contredites par Eckstein et al. qui montrent que les cellules T CD4⁺ naïves des ganglions lymphatiques sont au contraire productivement infectées et contribuent à la dissémination locale du VIH-1 chez l'Homme. Ces résultats mettent en lumière le rôle du microenvironnement en tant que support de la réplication virale (Eckstein et al., 2001).

Après activation et expansion clonale, une petite partie des cellules T CD4⁺ infectées subsiste en tant que cellules mémoires (Douek et al., 2002). Alors au repos, ces cellules mémoires sont infectées à l'état latent et constituent le plus grand réservoir viral chez les patients, traités ou non (Chun et al., 1997), (L. Zhang et al., 1999). De plus, ce réservoir de virus non détecté par le système immunitaire est particulièrement stable du fait de la longue durée de vie caractéristique du pool de cellules mémoires.

Longtemps, les lymphocytes T étaient le principal centre d'intérêt des recherches sur les virus de l'immunodéficience et le SIDA. L'implication de la lignée myéloïde dans l'infection productive par le VIH-1 fait l'objet d'un intérêt croissant. Un nouveau modèle de souris humanisée contenant seulement des cellules myéloïdes humaines a été mis au point en vue de confirmer l'apport des cellules myéloïdes dans l'infection par le VIH-1 (communication orale de Garcia JV, 2014).

b. Monocytes et macrophages

Issus de précurseurs myéloïdes dans la moelle osseuse, les monocytes circulent dans le sang pendant environ 2 jours (chez la souris) avant de se différencier en macrophages à leur arrivée dans les tissus (van Furth & Cohn, 1968). Résidants dans presque tous les tissus de l'organisme et à des positions stratégiques dans les muqueuses, les macrophages font office de sentinelles de l'immunité. Grâce à leurs propriétés phagocytaires, les macrophages participent aussi au maintien de l'homéostasie tissulaire via l'élimination des cellules mortes ou lésées (Mantovani, Biswas, Galdiero, Sica, & Locati, 2012).

Les macrophages activés expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et des molécules de costimulation requises pour leur permettre d'activer les lymphocytes T. Ainsi, en présentant l'antigène via le CMH-II, ils ont également vocation de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) mais leur efficacité est moindre que celle des cellules dendritiques qui sont les CPA professionnelles (Guidos, Wong, & Lee, 1984).

i) Infection des monocytes

Au cours de l'infection par le VIH-1 et le SIVmac, les monocytes sanguins contiennent de l'ADN viral mais la réplication virale ne semble pas productive (Innocenti, Ottmann, Morand, Leclercq, & Seigneurin, 2014), (Kuwata et al., 2007). En revanche, la stimulation *ex vivo* des monocytes par des facteurs pro-inflammatoires aboutit à une infection productive, de même que leur différenciation *in vitro* en macrophages (Lambotte et al., 2000), (Saidi et al., 2006). C'est pourquoi la lignée monocyttaire constituerait un réservoir de virus infectieux.

ii) Infection des macrophages

Les macrophages expriment CD4 à moindre niveau que les monocytes et lymphocytes T CD4⁺. Dans la plupart des cas, ils coexpriment CCR5, ce qui les rend donc susceptibles à l'entrée des VIH-1 et SIV. Toutefois, le phénotype des macrophages est très hétérogène et dépend de leur état de différenciation, de l'influence de leur microenvironnement ainsi que du tissu considéré (Okabe & Medzhitov, 2014). Nous verrons que les macrophages sont particulièrement abondants dans la muqueuse intestinale où ils présentent un phénotype et des propriétés uniques pour le maintien de l'homéostasie de cette muqueuse.

In vitro, les macrophages dérivés de monocytes humains sont infectables par le VIH-1. *In vivo*, la susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1 est connue depuis la fin des années 80 (Gartner et al., 1986). Dans la rate des patients infectés, la fréquence d'infection des macrophages est largement plus faible que celle des lymphocytes T CD4⁺ (McIlroy et al., 1996). La microscopie électronique a également permis la mise en évidence, au sein de macrophages primaires humains, de compartiments formés par des invaginations complexes de membrane plasmique qui servirait de « vacuoles de stockage » et de protection pour les particules virales (Welsch et al., 2007). Tous ces éléments convergent à faire des macrophages un abondant réservoir de virus chez les patients infectés par le VIH-1.

Par ailleurs, dans la mesure où les macrophages sont des CPA, le virus pourrait être transmis lors de la présentation antigénique, via le contact entre macrophage et lymphocyte T CD4⁺ (Carr, Hocking, Li, & Burrell, 1999). *In vitro*, les macrophages stimulés par l'interféron- γ (IFN- γ), cytokine produite notamment en réponse à une infection virale, favoriserait le recrutement de lymphocytes T CD4⁺ co-exprimant CXCR4 et CCR5 et la production de virions par ces cellules recrutées (Saidi et al., 2006).

La durée de vie des macrophages diffère considérablement, là encore selon leur localisation tissulaire et également selon leur fonction. A l'état basal, les macrophages des alvéoles pulmonaires ou bien encore les cellules de la microglie auraient une durée de vie de plusieurs années (Tarling, Lin, & Hsu, 1987), (Alliot, Godin, & Pessac, 1999), favorisant la persistance du VIH-1. Historiquement, il est décrit que les macrophages ne prolifèrent pas mais ce paradigme est remis en cause depuis peu par des études révélant l'existence d'une sous-population de macrophages tissulaires qui posséderait la capacité de proliférer localement, notamment en situation inflammatoire (Jenkins et al., 2011), (Hashimoto et al., 2013). Finalement, il a été montré *in vitro* que le virus de l'herpès 8 (HHV8 ou virus de l'herpès associé au syndrome de Kaposi) est capable d'activer la production de VIH-1 par les macrophages infectés à l'état latent (Caselli, 2005). Ces observations laissent penser que les infections opportunistes virales chez les patients infectés pourraient probablement contribuer à la production de virus par les macrophages à des stades tardifs de la maladie et favoriseraient ainsi le déficit immunitaire associé. Chez l'Homme et les PNH, les macrophages infectés sont de plus impliqués dans l'apparition de dysfonctionnements neurologiques associés au SIDA (revus par (González-Scarano & Martín-García, 2005)).

c. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC pour « dendritic cells ») doivent leur nom aux nombreux prolongements semblables aux dendrites des neurones qui leur donnent une forme étoilée. Ce sont des cellules rares dans l'organisme puisqu'elles représentent moins de 1% des leucocytes sanguins et seulement jusqu'à 3% des cellules de la peau et des muqueuses (Haller Hasskamp, Zapas, & Elias, 2005). Pourtant, elles jouent un rôle central au sein du système immunitaire en tant que CPA professionnelles. Issues des mêmes cellules souches myéloïdes que les monocytes/macrophages, les DC expriment CD4 et CCR5 ou CXCR4 selon leur état de maturation et leur localisation tissulaire. Il existe plusieurs types de DC : les DC myéloïdes (mDC), les DC plasmacytoïdes (pDC) et les cellules de Langerhans (LC) retrouvées dans la peau. Bien que rare, l'infection des mDC et LC a été mise en évidence *in vivo* chez l'Homme et les PNH ; les pDC sont infectables *in vitro* par le VIH-1. (Henry, Uthman, Ballaun, Stingl, & Tschachler, 1994), (McIlroy et al., 1995), (Zimmer, 2002), (Donaghy, 2003).

En outre, la molécule DC-SIGN exprimée en surface des cellules dendritiques favoriserait l'entrée du VIH-1 (et de multiples souches de SIV) dans ces cellules. Particulièrement abondantes dans les muqueuses, les DC exprimant la protéine DC-SIGN fonctionnelle internalisent plus de virus que les DC exprimant une protéine artificiellement tronquée (Kwon et al., 2002). Cette internalisation permettrait le transport des virions pendant la migration des cellules dendritiques jusqu'aux organes lymphoïdes. Dans les ganglions lymphatiques, les DC infectées activeraient les cellules T spécifiques en leur délivrant le virus en un « baiser mortel » (Geijtenbeek et al., 2000).

d. Autres cellules cibles du VIH-1

Une sous-population de cellules NK (Natural Killer) CD16⁺ CD56⁺ CD3⁻ exprime CD4 et les corécepteurs d'entrée du virus. Ces cellules tueuses de l'immunité innée sont infectées *in vivo* par le VIH-1 et persistent chez les patients traités, constituant potentiellement une autre source de virus infectieux à long terme (Valentin et al., 2002).

Nombre de types cellulaires ont été décrits comme pouvant contenir de l'ADN viral de HIV-1 intégré au génome cellulaire (provirus). C'est le cas notamment des lymphocytes T CD8⁺, des cellules endothéliales, des cellules souches hématopoïétiques et des astrocytes. Toutefois, la réplication virale dans ces types cellulaires est abortive et ne contribue pas à la production de virus *in vivo* (pour revue, (Iordanskiy, Santos, & Bukrinsky, 2013)).

L'infection par le VIH-1 sollicite tous les acteurs essentiels du système immunitaire inné et adaptatif. La pathogenèse mise en place par l'infection évolue invariablement vers le décès des patients infectés en l'absence de traitement selon un processus dynamique et extrêmement complexe.

B. Une pathogenèse en 3 phases

La progression de la pathologie suivant l'infection par le VIH-1 est classiquement décrite en trois phases : la phase aiguë ou primo-infection, la phase chronique ou asymptomatique et la phase SIDA (**Figure 4**).

1. Généralités

La primo-infection suit la contamination de l'organisme par le virus. Pendant les premières semaines, il est décrit qu'une proportion non négligeable de patients présentent des signes cliniques dont les plus communs ressemblent à ceux d'une grippe (céphalées, fatigue, fièvre, myalgies,...) (Vanhems et al., 2000). La sévérité et la durée des symptômes ont une valeur pronostique et coïncident avec une charge virale plasmatique élevée (de 10^6 à 10^7 copies d'ARN viral par ml de plasma) et la dissémination du virus dans les ganglions lymphatiques (Kahn & Walker, 1998), (Lyles et al., 2000). Dans le sang périphérique, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue. Une caractéristique majeure de la phase aiguë est l'activation du système immunitaire. Elle est accompagnée d'un contrôle partiel de la réplication virale, notamment grâce aux cellules «Natural Killer » (NK) (Alter, 2005) et aux lymphocytes T cytotoxiques (Borrow, Lewicki, Hahn, Shaw, & Oldstone, 1994). Malgré cela, le niveau de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique n'est pas complètement restauré.

Nous reviendrons tout particulièrement sur la phase aiguë de l'infection au sous-chapitre suivant où nous insisterons sur l'importance d'étudier cette étape décisive de l'infection. Nous aborderons l'apport des modèles simiens dans sa compréhension.

En l'absence d'intervention thérapeutique, la phase chronique de l'infection dure entre de 8 à 12 ans avant l'apparition des symptômes caractérisant la phase SIDA. L'activation du système immunitaire persiste et augmente graduellement. La remarquable variation génétique du virus, la mise en place de réservoirs cellulaires et anatomiques ainsi que l'échappement à la réponse immunitaire contribuent à la persistance de la réplication virale.

Parallèlement, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants continue de diminuer graduellement, de 25 à 60 cellules/ μ l par année en moyenne selon les individus (Lang et al., 1989).

Après une dizaine d'années sans traitement, l'exhaustion du système immunitaire due à son activation soutenue et la disparition graduelle des lymphocytes T CD4⁺ s'accompagnent d'un rebond de la charge virale plasmatique. La détérioration du système immunitaire permet l'émergence d'infections opportunistes (comme la pneumocystose à *pneumocystis carinii* évoquée au chapitre I.A.1) et de certains cancers qui caractérisent la phase symptomatique du SIDA.

2. Cas particuliers

L'évolution de la charge virale et de la réponse immunitaire n'est pas la même entre individus infectés. On estime qu'entre 1 à 5% des personnes infectées progressent plus lentement dans la pathologie. Ce sont les non progressseurs (ou LTNP pour « Long Term Non Progressors »). Ces estimations sont rendues difficiles par le fait que toutes les études n'utilisent pas les mêmes critères pour définir le caractère « non progressseurs » des patients. (pour revue, (Sabin & Lundgren, 2013)). Ainsi en France seulement 0,4% des patients enregistrés dans la banque de données des hôpitaux seraient des LTNP (Grabar et al., 2009). Chez ces personnes, même en l'absence de traitement, la virémie demeure faible et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est maintenu à un niveau relativement stable (Grabar et al., 2009).

A l'opposé, il existe une autre catégorie de patients appelés « progressseurs rapides » qui évoluent vers le stade SIDA en moins de trois ans. Plus nombreux, ils représenteraient de 5 à 10% des personnes infectés par le VIH-1 (Phair, 1994), (Sheppard et al., 1993).

Ces différents modes de progression de la pathologie sont très étudiés pour mieux comprendre les facteurs protecteurs ou aggravants de la pathogenèse virale. Ces différences peuvent être dues à des facteurs génétiques de l'hôte tels que le polymorphisme pour certains haplotypes HLA (« Human Leucocyte Antigen ») de classe I, tel que le HLA-B57 (Goulder et al., 1996) ou, comme nous l'avons vu précédemment, certaines mutations affectant les récepteurs et corécepteurs du virus. La qualité de la réponse cellulaire cytotoxique (Ogg, 1998) et la persistance de la réponse CD4⁺ spécifiques (Hogg et al., 2001), (Goujard et al., 2006) seraient cruciales pour un meilleur contrôle de la virémie.

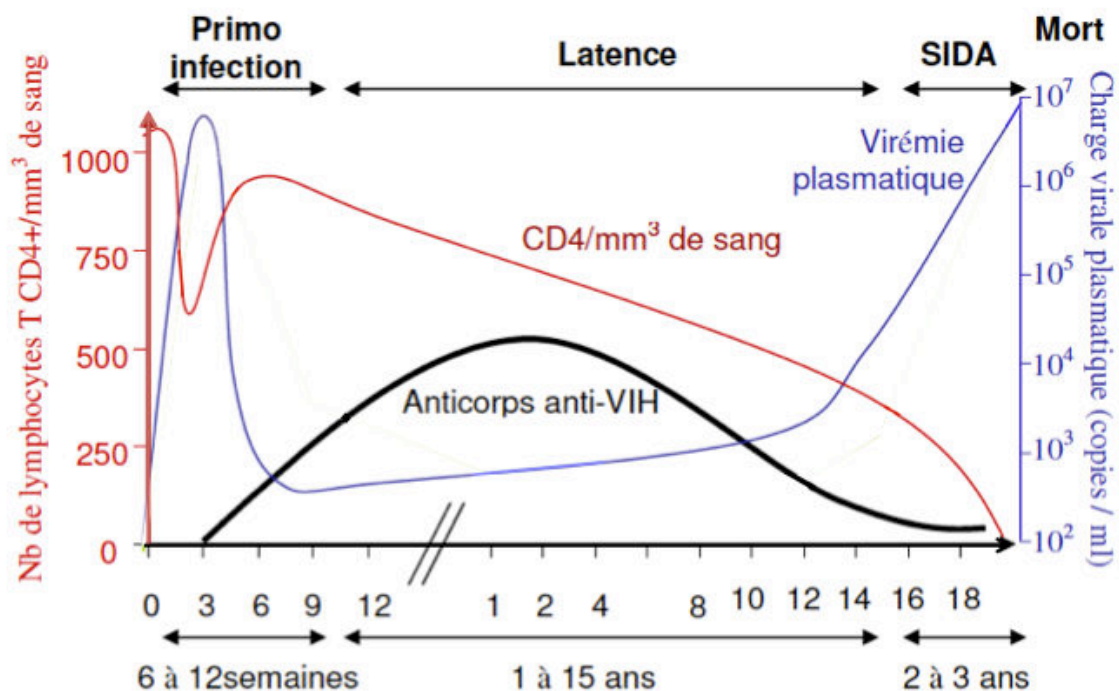


Figure 4 : Modèle général des trois phases cliniques de l'infection par le VIH-1.

Ces phases sont définies à partir de l'évolution au cours du temps de la virémie plasmatique (en bleu) et du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants (en rouge). A titre indicatif (en unités arbitraires), la production d'anticorps spécifiques des antigènes viraux apparaît également (en noir).

C. Pertinence des modèles PNH pour l'étude de la primo-infection

1. Apport des modèles PNH

Les événements très précoces survenant après la transmission du virus sont difficilement analysables chez l'Homme. Notons que dans la littérature traitant de l'infection à VIH, le qualificatif de « primo-infection » est parfois employé jusqu'à un an après le moment estimé de la contamination des patients. De plus, les analyses les plus précoces chez l'Homme ont très certainement lieu le plus souvent sur des individus symptomatiques, peut-être non représentatifs de l'ensemble de la population. Toutefois, les études des patients en primo-infection ont révélé que les événements immunologiques et virologiques sont déterminants pour la progression de la pathologie (Weissman, Barker, & Fauci, 1996), (Perrin, 1999), (Lyles et al., 2000), (Pantaleo et al., 1997).

C'est pourquoi les PNH infectés par le SIV sont particulièrement pertinents, voire incontournables comme modèles d'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH. En outre, l'utilisation des modèles primates pathogènes autorise l'exploration de différents protocoles de contamination : choix du mode de transmission du SIV, de la dose et de la souche virale utilisée. Le macaque rhésus infecté par injection intraveineuse de l'isolat pathogénique SIVmac₂₅₁ constitue le modèle le plus largement répandu pour l'étude de la physiopathologie de l'infection. Enfin, les modèles PNH confèrent l'opportunité d'accéder plus largement aux organes lymphoïdes et non lymphoïdes, avantage majeur pour la compréhension de la physiopathologie de l'infection par le SIV.

2. Le tractus digestif pour cible

L'analyse des modèles simiens pathogènes a permis de confirmer la valeur pronostique des événements immunologiques et virologiques mis en place tôt après l'infection. En effet, il est maintenant bien établi que la charge virale au « set-point » (moment où la virémie sanguine se stabilise après le pic de réplication initial, **Figure 4**) est corrélée positivement avec la rapidité de progression de la maladie vers le SIDA (Lifson et al., 1997), (S. M. Smith et al., 1999). L'observation des organes infectés dès les premières heures après infection a permis de mettre en évidence que la réplication du SIV a lieu initialement dans la muqueuse intestinale, et ce, indépendamment des voies de transmission du virus, (Veazey, 1998), (Smit-McBride, Mattapallil, McChesney, Ferrick, & Dandekar, 1998), (Ribeiro dos Santos et al., 2011). Chez l'Homme en primo-infection (entre un mois et un an estimés après la contamination), l'intestin serait également une cible privilégiée de la réplication virale (Mehandru, 2004). En phase chronique, la proportion de lymphocytes T CD4⁺ infectés dans l'intestin est 10 fois supérieure à celle des cellules infectées dans le sang (Yukl et al., 2010).

Avant d'aller plus loin dans l'atteinte de la muqueuse intestinale en phase aiguë d'infection par le SIV, nous décrirons dans le chapitre suivant le rôle des lymphocytes T et des macrophages, cibles majeures du virus, dans la muqueuse saine ainsi que les processus de recrutement des lymphocytes T vers l'intestin.

III. LYMPHOCYTES T ET MACROPHAGES DE LA MUQUEUSE INTESTINALE SAINE

A. Zoom sur la muqueuse intestinale en conditions physiologiques

1. Généralités sur les muqueuses et les tissus lymphoïdes associés

Nous sommes constamment exposés à de nombreux agents infectieux susceptibles d'envahir notre organisme par différentes voies. Tous les vertébrés possèdent donc des mécanismes de défense naturelle qui opèrent dès les premières minutes en cas d'invasion par les micro-organismes. C'est seulement lorsque les défenses naturelles de l'hôte sont esquivées ou submergées comme dans le cas de l'infection par les VIH, qu'une réponse immune innée ou adaptative est requise.

a. Les épithéliums : premières défenses naturelles contre l'infection

Nos surfaces épithéliales corporelles constituent les premières défenses contre les infections. La peau et le tissu gastro-intestinal, respiratoire et uro-génital forment une barrière physique entre le milieu interne et l'extérieur au moyen de jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Les épithéliums des muqueuses contiennent des cellules caliciformes spécialisées dans la sécrétion du mucus, indispensable à l'évacuation des pathogènes (Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013). Plus que des obstacles physiques, les muqueuses produisent également des peptides anti-microbiens comme le lysozyme présent dans les larmes et la salive (Klockars & Reitamo, 1975) ou les α -défensines sécrétées par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle (D. E. Jones & Bevins, 1992). En plus de ces défenses, les muqueuses sont liées à une flore bactérienne non pathogène qui empêche la colonisation par d'autres bactéries. Microbiote et système immunitaire inné sont en contact étroit (Frantz et al., 2012).

Si ces premières lignes de défense naturelle sont évitées par un agent infectieux, alors une réponse immune est mise en place dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (MALT pour « Mucosa-Associated Lymphoid Tissue »).

b. Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT

Les épithéliums contiennent des cellules lymphoïdes, de même que la lamina propria située au-dessous de ces épithéliums. Tous les organes et tissus lymphoïdes assurent les mêmes fonctions: d'une part permettre la survie des lymphocytes naïfs qui n'ont pas encore rencontré leur antigène et d'autre part mettre en place la réponse immune grâce à la capture des antigènes et à leur présentation aux lymphocytes T et B. Les principaux MALT sont les tissus lymphoïdes associés au naso-pharynx (NALT), aux bronches (BALT) et les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT).

c. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin ou GALT

Il est communément décrit que le tractus digestif, de la cavité orale au rectum, mesure de 200 à 300m², soit la taille d'un terrain de tennis. Cependant, il faut noter que ces mesures empiriques se basent principalement sur des données obtenues lors d'autopsies. Les progrès de l'imagerie médicale ont permis d'effectuer des estimations plus précises. Très récemment, une étude scandinave basée sur des études macroscopiques radiologiques et de microscopie électronique estime la surface totale du tractus digestif à seulement 30m² (Helander & Fändriks, 2014).

Quoi qu'il en soit, l'intestin est un organe non seulement exposé tout au long de la vie à un panel d'antigènes issus de l'alimentation mais en plus colonisé par un microbiote dense et complexe en étroite relation avec son hôte. Le GALT est ainsi le tissu lymphoïde muqueux le plus conséquent de l'organisme dont le fonctionnement à l'état basal permet le maintien de la balance essentielle entre réponses immunitaires et mécanismes régulateurs.

2. Structure et fonction du tractus gastro-intestinal

Le tractus digestif est composé de l'intestin grêle, du caecum, du gros intestin ou colon et du rectum. L'intestin grêle, appelé petit intestin en fonction de son diamètre avoisinant les 3 centimètres, est divisé en 3 segments : le duodénum qui reçoit la substance alimentaire en provenance de l'estomac, le jéjunum et l'iléon qui précède le colon.

La majorité du processus de digestion a lieu dans l'intestin grêle qui mesure en moyenne 7 mètres de long chez l'Homme tandis que le colon plus petit (environ 1,40 mètres de long) est responsable de l'absorption de l'eau contenue dans les résidus de la digestion.

L'intestin grêle représente la surface la plus importante du tractus digestif (Cornes, 1965), (Helander & Fändriks, 2014) et **Figure 5**.

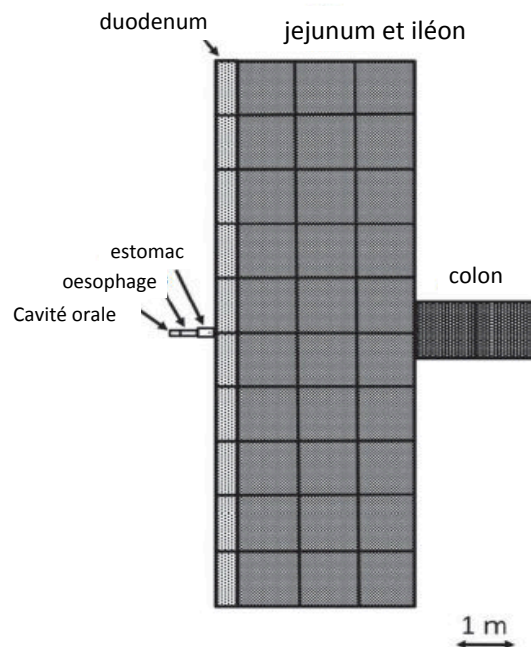


Figure 5: Distribution anatomique des surfaces muqueuses le long du tractus digestif.
Représentation schématisée. De la cavité orale au colon, l'intestin grêle constitue la plus grande surface muqueuse au contact de la lumière. D'après (Helander & Fändriks, 2014).

a. Une vision histologique de l'intestin grêle

i) Structure histologique générale de la paroi intestinale

De l'intérieur vers l'extérieur, l'intestin grêle et le colon sont constitués de plusieurs couches (**Figure 6**):

- la **muqueuse** composée d'un épithélium monostratifié prismatique (aux cellules plus hautes que larges) et de la lamina propria sous-jacente
- la **musculaire-muqueuse**: fine couche de cellules musculaires lisses séparant la muqueuse de la sous-muqueuse,
- la **sous-muqueuse** est une couche de tissu conjonctif lâche élastique qui soutient la muqueuse et autorise sa flexibilité pendant le péristaltisme. La sous-muqueuse est richement innervée et vascularisée et contient de nombreux vaisseaux lymphatiques qui rejoignent ou drainent la muqueuse.

- la **musculeuse**, épaisse tunique composée de deux couches de cellules musculaires lisses, l'une circulaire et l'autre longitudinale ; responsables du péristaltisme synchronisé dirigeant le contenu de la lumière d'amont en aval.

- la **tunique externe** ou adventice riche en tissu conjonctif.

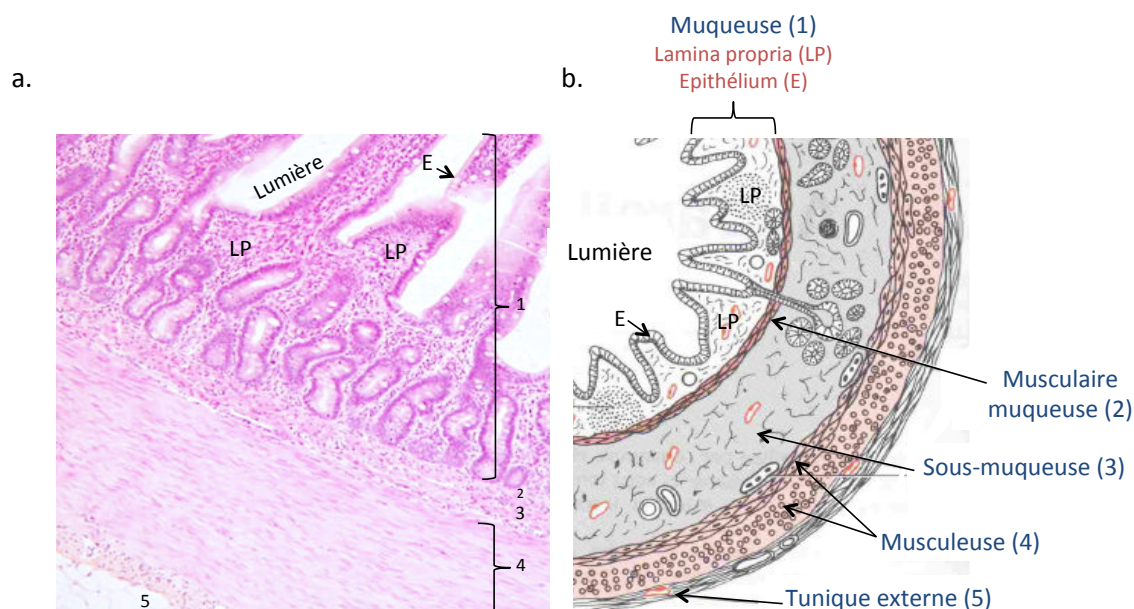


Figure 6 : Structure histologique de l'intestin grêle.

a. coupe d'iléon de macaque rhésus sain après coloration en hématoxyline/éosine, schématisée en b. Au contact de la lumière, la muqueuse montre de nombreux replis. Elle est supportée à l'extérieur par la musculaire-muqueuse, elle-même au contact de la sous-muqueuse (très développée dans le schéma). La musculaire et la tunique sont les feuillets les plus externes.

ii) Histologie de la muqueuse de l'intestin grêle

• Quatre degrés de repliement

Immédiatement au contact de la lumière, la muqueuse est constituée de l'épithélium monostratifié et de la lamina propria sous-jacente. L'épithélium de l'intestin grêle est caractérisé par quatre degrés de repliement : dans chaque **pli circulaire**, différents **villi** (ou villosités) forment des protrusions en « doigts de gant » alors que les **cryptes** de Lieberkühn contenant les cellules souches responsables du renouvellement de l'épithélium forment de profondes invaginations. A la surface apicale des cellules épithéliales, les **microvilli** (ou microvillosités) constituent la bordure en brosse hautement spécialisée pour l'absorption finale des nutriments (**Figure 7**).

Supportant l'épithélium, la **lamina propria** sert mécaniquement de tissu de soutien et contient de nombreuses cellules immunitaires diffuses. Elle est beaucoup plus développée au niveau de l'intestin grêle que du colon.

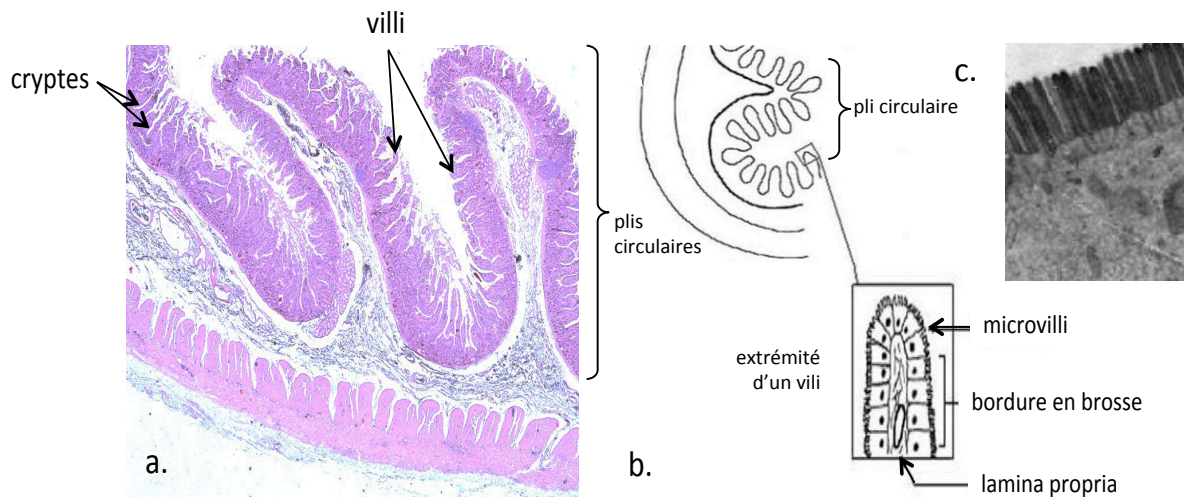


Figure 7 : Les différents degrés de repliement de l'intestin grêle.

a. Coupe d'iléon de macaque rhésus sain après coloration en hématoxyline/éosine. Les plis circulaires sont bien visibles à l'œil nu et sont formés de nombreux replis plus petits, les villi, visibles en microscopie optique et formant des protrusions vers la lumière intestinale alors que les cryptes s'invaginent profondément dans la sous-muqueuse. b. Représentation schématique des degrés de repliement de la muqueuse de l'intestin grêle. Dans chaque pli circulaire, les villi impliquent l'épithélium et la lamina propria sous-jacente. Visibles en microscopie électronique, la membrane apicale des cellules épithéliales s'invagine régulièrement pour former les microvilli constituant la bordure en brosse. c. photographie de la bordure en brosse en microscopie électronique.

• Structures lymphoïdes organisées de la muqueuse

L'initiation de la réponse immune se produit dans des structures lymphoïdes dont l'organisation rappelle celle des ganglions lymphatiques : les **follicules lymphoïdes isolés** (ILF pour « Isolated Lymphoid Follicles »). Chez l'Homme, la muqueuse de l'intestin grêle contiendrait plus de 30 000 ILF dont la densité et la taille augmentent du duodénum à l'iléon (Hamada et al., 2002) (Lorenz, Chaplin, McDonald, McDonough, & Newberry, 2003). La partie distale de l'iléon se distingue également par l'apparition de gros agrégats lymphoïdes visibles macroscopiquement appelés **Plaques de Peyer (Figure 8)**.

3. Les compartiments du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)

Le système immunitaire muqueux est divisé en sites inducteurs et effecteurs distincts. Les sites inducteurs des réponses T et B font référence à des tissus lymphoïdes bien organisés que sont les follicules isolés ou les plaques de Peyer, alors que les sites effecteurs sont constitués de cellules immunitaires isolées réparties dans l'épithélium muqueux et dans la lamina propria sous-jacente (Figure 8).

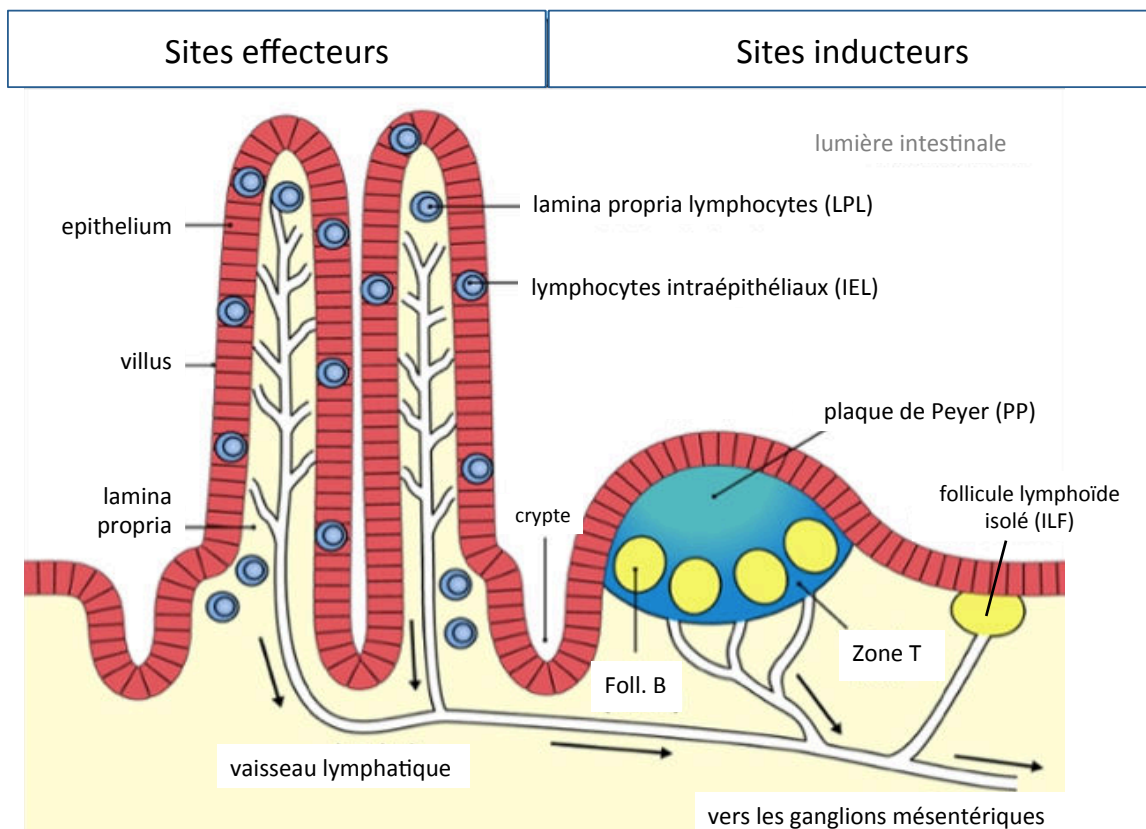


Figure 8 : Représentation schématique des compartiments du GALT.

Les sites inducteurs sont les follicules lymphoïdes isolés (ILFs) et, à la partie distale de l'iléon, les plaques de Peyer (PP). Les sites effecteurs sont constitués de cellules immunitaires diffuses dans l'épithélium (IEL) et la lamina propria (LPL). D'après (Mowat, 2003)

La lamina propria contient notamment de nombreux macrophages et lymphocytes T $CD4^+$, faisant d'elle une cible particulière lors de l'infection par les VIH/SIV.

B. Les macrophages et les lymphocytes T de la lamina propria et leur fonction pour le maintien de l'homéostasie des muqueuses

La muqueuse saine contient de nombreuses cellules de l'immunité innée. Mastocytes, éosinophiles et basophiles interagissent avec les cellules épithéliales et même les cellules nerveuses de la muqueuse et constituent une première défense rapide contre l'invasion par les pathogènes (Kurashima, Goto, & Kiyono, 2013). Les macrophages intestinaux sont les plus nombreux représentants de l'immunité innée dans la lamina propria où ils se distinguent des macrophages des autres tissus. Les macrophages de l'intestin constituent la plus grande population de phagocytes mononucléés du corps (extrapolation basée sur des analyses par immunohistochimie chez la souris adulte, (S. H. Lee, Starkey, & Gordon, 1985)). Issus des monocytes sanguins CD14⁺ chez l'Homme et les PNH, ils se localisent de façon stratégique dans la lamina propria après différenciation en macrophages tissulaires. Cependant, de récentes études documentent que les macrophages résidants des tissus chez l'adulte proviendraient directement de progéniteurs embryonnaires ; ces données encore controversées apportent une nouvelle vision sur l'origine des macrophages tissulaires et suggèrent l'existence de deux sous-populations de macrophages (Sieweke & Allen, 2013).

1. Macrophages résidants dans la lamina propria saine

Chez l'Homme, à l'état physiologique, les macrophages résidants de la lamina propria possèdent la propriété unique de phagocyter et digérer les micro-organismes sans induire de réponse inflammatoire - contrairement à leurs homologues retrouvés dans les autres tissus (Smythies et al., 2005). Ils jouent donc un rôle central pour prévenir les réponses inappropriées aux bactéries commensales et antigènes alimentaires. Chez la souris, la capacité proliférative des macrophages apparaît controversée, il est fort probable que les macrophages de la lamina propria ne prolifèrent pas a contrario des cellules de Kupffer du foie ou des macrophages alvéolaires (pour revues : (Zigmond & Jung, 2013) et (Jenkins & Hume, 2014)). Les macrophages résideraient donc dans la lamina propria plusieurs semaines à plusieurs mois avant de subir l'apoptose et d'être remplacés par des monocytes nouvellement recrutés, notamment via la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) et de TGF β (« Transforming Growth Factor β ») par les cellules stromales de la lamina propria (Smythies, 2006).

Après différenciation, les macrophages intestinaux chez l'Homme expriment la majorité des récepteurs retrouvés en surface des monocytes comme la molécule HLA-DR (pour « Human Leukocyte Antigen) du CMH de classe II ainsi que la majorité des TLR (pour « Toll-Like Receptors ») impliqués dans l'immunité innée (Pavli, Maxwell, Van de Pol, & Doe, 1996). En revanche, contrairement aux autres tissus, la plupart des macrophages de la lamina propria n'expriment pas les molécules de costimulation requises pour la présentation antigénique telles que CD40, CD80 et CD86 ni ne produisent de cytokines costimulatoires nécessaires à l'expansion des sous-populations de lymphocytes T (Rogler et al., 1998). Dans la muqueuse saine, ils n'expriment pas non plus CD14, le récepteur au lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Rogler et al., 1998), (Smythies et al., 2005). Toutefois, comme la plupart des macrophages tissulaires, ils sont caractérisés par l'expression de CD68 (Pavli et al., 1996), (Pilling, Fan, Huang, Kaul, & Gomer, 2009) et PM-2K (Ribeiro dos Santos et al., 2011).

2. Recrutement pathologique de monocytes vers la muqueuse intestinale

Chez les patients atteints de pathologies inflammatoires de l'intestin (IBD pour « inflammatory bowel disease »), des études immunohistologiques à partir de biopsies ont mis en évidence l'expression de CD14 dans les lésions, suggérant l'arrivée récente et massive de monocytes sanguins (Rugtveit et al., 1997b). Cette hypothèse a pu être joliment confirmée par réinoculation des monocytes CD14⁺ des patients après marquage au technetium^{99m} (Grimm et al., 1995). Une augmentation de la production des chimiokines CCL2 (MCP-1 pour « monocyte chemoattractant protein-1 ») et CCL4 (MIP-1β pour « macrophage inflammatory protein-1 β), connues pour leur propriété attractante sur les monocytes, au niveau des lésions a également été montrée. Il semble que les monocytes recrutés dans la muqueuse inflammatoire ou infectée via la sécrétion induite de chimiokines conservent leurs propriétés inflammatoires afin de contenir l'infection (Rugtveit, Bakka, & Brandtzaeg, 1997a), (Takeya, Tsuchiya, Shimokawa, & Takahashi, 1991)

Les macrophages de la muqueuse saine expriment à un faible niveau le récepteur CD4 et les corécepteurs au VIH-1 CCR5 et CXCR4, ce qui restreint leur permissivité à l'infection par le virus (Kazazi, Mathijs, Foley, & Cunningham, 1989), (Graziani-Bowering & Filion, 2000). Une publication récente de Shen R. et collaborateurs montre que le surnageant des cellules stromales de la lamina propria diminuent drastiquement l'expression de CD4 et CCR5 en surface des macrophages *ex vivo* en cours de différenciation. Cette étude suggère donc un rôle du microenvironnement intestinal sur la susceptibilité des macrophages de la muqueuse à l'infection par le VIH-1 (Shen et al., 2011).

Lorsque les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ou les SIV infectent la muqueuse gastro-intestinale, ceux-ci pénètrent dans la lamina propria subépithéliale où ils rencontrent un grand réservoir de cellules cibles, non seulement de macrophages mais en particulier d'abondants lymphocytes T CD4⁺ hautement permissifs.

3. Principes généraux et identification des principales sous-populations de lymphocytes T chez le macaque rhésus

La définition des critères phénotypiques pour l'identification des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ a permis de reconnaître deux principaux compartiments : (i) le compartiment naïf est constitué des lymphocytes T n'ayant pas rencontré leur antigène spécifique caractérisés notamment par un répertoire étendu, un potentiel élevé de prolifération et une recirculation continue à travers les tissus lymphoïdes secondaires. Après reconnaissance du complexe antigène/CMH en surface des CPA, les lymphocytes T récemment activés subissent une expansion clonale pour se différencier en cellules effectrices. Une partie des lymphocytes effecteurs migre dans les zones B des centres germinatifs des organes et tissus lymphoïdes secondaires. L'autre partie exprime des récepteurs aux chimiokines qui permettront l'entrée dans les tissus extra-lymphoïdes. Chez l'Homme comme chez les PNH, une petite population de lymphocytes T activés persistera et constitue (ii) le compartiment mémoire qui contient donc les lymphocytes T dont le TCR a été sélectionné par la rencontre avec l'antigène et dont les propriétés migratoires sont restreintes (Mackay, Marston, & Dudler, 1990), (Lanzavecchia & Sallusto, 2000).

Par conséquent, les lymphocytes T naïfs matures se caractérisent par l'expression de niveaux élevés de molécules de surface impliquées dans la migration vers les tissus lymphoïdes (CD62L, CCR7 chez la souris et l'Homme) et de molécules de costimulation (CD27, CD28) (Picker et al., 1990) ; ils n'expriment pas les molécules impliquées dans la migration vers les sites extra-lymphoïdes (CCR5) (Bleul, Wu, Hoxie, Springer, & Mackay, 1997). Chez l'Homme, ils sont également caractérisés par l'expression de CD45RA, l'isoforme longue de CD45 (ou LCA pour « Leucocyte Common Antigen ») (Mackay, 1999). Au contraire, les lymphocytes T mémoires - lymphocytes T mémoires centraux (TCM) et les lymphocytes T mémoires effecteurs (TEM) – sont caractérisés chez l'Homme par l'expression de CD45RO (isoforme courte de CD45) après stimulation antigénique et n'expriment plus CD45RA. Les TCM et TEM sont également caractérisés par l'expression de CD27 et le récepteur de Fas (« apoptosis stimulating Fragment ») ou CD95 (Morimoto & Schlossman, 1993), (Hamann et al., 1999).

Chez la souris, les TCM circulent dans les ganglions lymphatiques et ont des fonctions effectrices limitées (Butcher & Picker, 1996), (De Rosa, Herzenberg, Herzenberg, & Roederer, 2001). Une seconde stimulation induit leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices. Le dogme en vigueur veut que seuls les TEM possèdent la capacité de migrer dans les tissus extra-lymphoïdes périphériques pour y produire rapidement des cytokines effectrices dépendamment de la stimulation antigénique (Sallusto, Lenig, Förster, Lipp, & Lanzavecchia, 1999).

Il est à noter que chez le macaque rhésus, Pitcher et collègues ont démontré que l'utilisation de CD45RA ne permettait pas de différencier les LT naïfs des LT mémoires. Ainsi, les compartiments lymphocytaires T sont définis sur la base de l'expression de la molécule de costimulation CD28 et CD95 (Pitcher et al., 2002) et **Figure 9**.

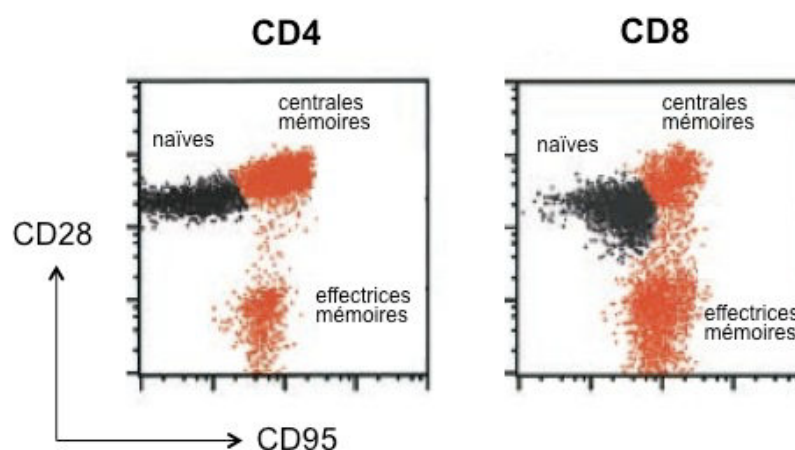


Figure 9 : Identification des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves, centrales mémoire et effectrices mémoires dans la circulation des macaques rhésus par cytométrie de flux.

L'expression des marqueurs d'activation CD95 et CD28 permet d'identifier les cellules T naïves (CD28⁺ CD95⁻), les cellules centrales mémoires (CD28⁺ CD95⁺) et les cellules mémoires effectrices (CD95⁺ CD28⁻). D'après (Pitcher et al., 2002)

4. Les lymphocytes T du GALT

Il est communément accepté par la communauté des immunologistes que le tractus intestinal représenterait le plus grand compartiment lymphoïde chez l'Homme en terme de nombre de lymphocytes. Ce paradigme a été remis en cause par de nouvelles estimations qui proposent que le GALT, chez l'Homme comme chez la souris, contiendrait plutôt entre 5 à 20% des lymphocytes totaux de l'organisme (Ganusov & De Boer, 2007).

Néanmoins, une autre équipe s'intéressant cependant aux lymphocytes B montre que 70% d'entre elles résident dans la lamina propria (Pabst, Russell, & Brandtzaeg, 2008). Est-ce que l'intestin chez l'Homme adulte contient plus de lymphocytes T que la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse? La question, toujours matière à débat, est rendue complexe par la dynamique de circulation des lymphocytes, leur cinétique d'entrée et de sortie, le temps de transit dans les tissus, la prolifération locale et l'apoptose qui sont autant de facteurs critiques et complexes pour l'estimation de la distribution de ces cellules. Toutefois il est certain que le GALT et en particulier dans l'intestin grêle, le segment le plus long, contient une proportion importante de lymphocytes T.

Chez le macaque rhésus comme chez l'Homme, les lymphocytes T CD3⁺ de la lamina propria saine co-expriment soit le récepteur CD4 soit le récepteur CD8 alors que l'épithélium contient quasi-exclusivement des cellules T cytotoxiques CD8⁺ (Veazey et al., 1997) et **Figure 10**.

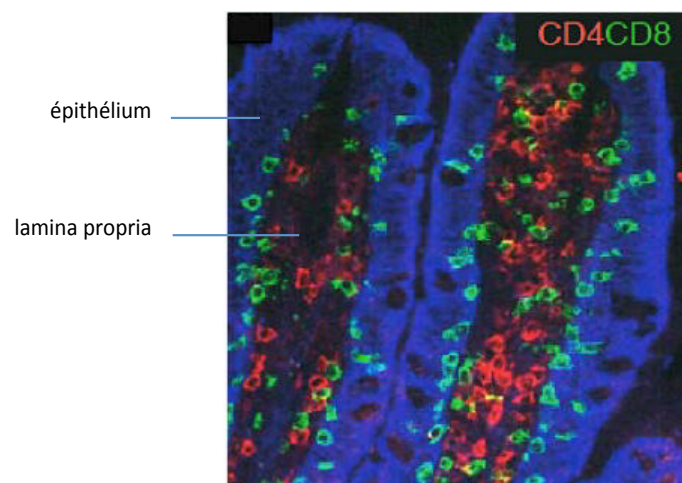


Figure 10 : Immunohistofluorescence sur coupe d'intestin grêle humain (duodénum).
La section des villi montre la répartition des lymphocytes T CD4⁺ (rouge) et CD8⁺ (vert) dans la lamina propria alors que l'épithélium (bleu) contient quasi-exclusivement des cellules T CD8⁺. Les macrophages exprimant également CD4 sont aussi révélés. D'après Brandtzaeg P. et al, 2007

a. Lymphocytes CD8⁺ intra-épithéliaux

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL pour « Intra-Epithelial Lymphocytes ») sont retrouvés entre les cellules épithéliales de différents tissus notamment la peau (Havran, Chien, & Allison, 1991), les poumons (Pabst, Schuster, & Tschernig, 1999) et la cavité buccale (Mega et al., 1992). Les IEL sont quasi-exclusivement des lymphocytes et la plus grande population résiderait dans l'épithélium prismatique monostratifié de l'intestin (Ferguson, 1977).

Une caractéristique majeure partagée par les IEL est l'expression de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ qui interagit avec la E-cadhérine des cellules épithéliales, favorisant leur rétention localisée (Jenkinson et al., 2010), (Cerf-Bensussan et al., 1987). Dans l'intestin grêle de la souris comme chez l'Homme ou le macaque rhésus, les IEL sont majoritairement des lymphocytes T CD8⁺ (Veazey et al., 1997), dont le CD8 non conventionnel est composé d'homodimères $\alpha\alpha$; 15% des IEL possèdent un TCR $\gamma\delta$ alors que la lamina propria ne contient qu'une petite population de lymphocytes T $\gamma\delta$ comparable aux lymphocytes circulants (Deusch et al., 1991). La migration des IEL diffère aussi des processus classiques de homing décrits pour les lymphocytes T. En effet, chez la souris, les IEL acquièrent leurs récepteurs de homing ($\alpha_E\beta_7$ et CCR9) dans le thymus, de façon dépendante de l'IL-7 (Shitara et al., 2013).

b. Lymphocytes T de la lamina propria

Les lymphocytes T de la lamina propria (LPL) sont bien décrits chez les PNH où ils ont fait l'objet de nombreuses études dans le contexte de l'infection par le SIV. Chez la souris, les LPL de l'intestin grêle sont majoritairement de type helper (Goodyear, Kumar, Dow, & Ryan, 2014). Chez le macaque rhésus, les résultats diffèrent sensiblement selon la méthode d'estimation utilisée, la grande majorité des estimations étant basée sur la dissociation mécanique et enzymatique des LPL suivie de leur analyse en cytométrie de flux. La plupart des études observent un ratio CD4/CD8 proche de 1 dans le jéjunum sain (Veazey et al., 1997), (Kenway-Lynch, Das, Pan, Lackner, & Pahar, 2013), (Verhoeven et al., 2014) tandis que certaines publications montrent parfois une majorité de cellules T CD4⁺ (Pahar, Lackner, & Veazey, 2006) ou à l'inverse des cellules cytotoxiques plus nombreuses au sein des LPL isolés (Smit-McBride et al., 1998). Ces résultats dénotent une efficacité d'isolement des LPLs variable selon les protocoles utilisés. Toutes les études s'accordent cependant sur le fait que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de la lamina propria sont majoritairement de phénotype mémoire.

i) Phénotype des LPL de la muqueuse saine

Chez l'Homme, l'extraction des lymphocytes T de la lamina propria à partir de biopsies a permis d'établir que 90% sont de phénotype mémoire/activé (Schieferdecker et al., 1990). Ainsi les LPL sont CD45RO⁺, CD25⁺ et CD95⁺. Chez le macaque rhésus, les LPL CD4⁺ et CD8⁺ sont également majoritairement de type mémoire. Le phénotype des cellules LPL CD4⁺ est beaucoup mieux décrit du fait du tropisme des virus de l'immunodéficience pour ces cellules.

Le pourcentage des LPL CD4⁺ qui expriment CCR5 ainsi que le taux d'expression de CCR5 par cellule sont augmentés par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique, ce qui fait de cette population une cible privilégiée des VIH/SIV (Meng et al., 2000) (Anton et al., 2000). Le pourcentage de cellules T CD4⁺ exprimant CXCR4 est similaire dans la lamina propria et les PBMC (« Peripheral Blood Mononuclear Cells ») mais la majorité des LPL CCR5⁺ chez l'Homme semblent co-exprimer le récepteur CXCR4 ; cette double expression des corécepteurs au VIH-1 rend les LPL d'autant plus permissifs à l'infection par les VIH et SIV (Poles, Elliott, Taing, Anton, & Chen, 2001).

Tous les TEM CD4⁺ de la lamina propria sont également caractérisés par l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ chez le macaque rhésus (Kader, Bixler, Roederer, Veazey, & Mattapallil, 2009a). Plus précisément, 25% d'entre eux seraient $\alpha_4^+\beta_7^{\text{high}}$ ($\alpha_4^+\beta_7^{\text{hi}}$) tandis que les 75% restants exprimeraient β_7 à un niveau intermédiaire ($\alpha_4^+\beta_7^{\text{int}}$) ; les cellules $\alpha_4^+\beta_7^{\text{hi}}$ seraient préférentiellement infectées par le VIH/SIV (Kader, Bixler, Roederer, Veazey, & Mattapallil, 2009a) au cours de la phase aiguë de l'infection (Nawaz et al., 2011).

Chez l'Homme, les cellules T régulatrices (Treg) de l'intestin grêle sont plus nombreuses que dans les autres tissus périphériques et possèdent également un phénotype mémoire/activé caractéristique, contrairement aux Treg des ganglions périphériques et de la rate (Guo et al., 2008).

ii) Fonctions des cellules T de la lamina propria

Chez l'Homme et les PNH, les lymphocytes T isolés des plaques de Peyer et de la lamina propria de l'intestin grêle sécrèteraient en majorité de l'interféron- γ (IFN- γ), de l'interleukine-17 (IL-17) et de l'Interleukine-22 (IL-22) (Brenchley et al., 2008), (Liang et al., 2006). *Ex vivo*, les lymphocytes T du GALT stimulés vont donc majoritairement s'orienter vers des réponses de type Th1 (sécrétrices d' IFN- γ , (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin, & Coffman, 2005)) et Th17 (productrices d'IL-17 et IL-22).

Le rôle des Th1 pro-inflammatoires est bien décrit. La sous-population de cellules Th17 fait l'objet d'investigations plus récentes puisque la caractérisation du lignage Th17 chez la souris date de 2005 (L. E. Harrington et al., 2005). Etant donné que leur rôle dans l'immunité muqueuse est particulièrement étudié dans le cadre de l'infection par le VIH et les SIV, nous détaillerons uniquement la fonction des lymphocytes Th17.

• Rôle des lymphocytes Th17

Chez le macaque rhésus, la perte des cellules Th17 dans la muqueuse iléale est associée à l'infection systémique par *Salmonella typhimurium*, une bactérie dont la dissémination est normalement contrôlée par les réponses inflammatoires (Raffatellu et al., 2008). Par ailleurs, les individus atteints de mutations affectant la cytokine IL-17 ou son récepteur (IL-17RA), développent des atteintes chroniques cutanéomuqueuses causées par *Candida Albicans*, normalement commensale chez son hôte (Puel et al., 2011). Ces résultats démontrent le rôle des lymphocytes Th17 dans la protection contre les pathogènes extracellulaires et en particulier au niveau des muqueuses. De plus, chez les patients atteints de la maladie de Crohn la balance Th17/Treg serait affectée en faveur des Th17 et directement liée au nombre de lymphocytes Th17 dans la lamina propria du colon (Pene et al., 2008). Les cellules Th17 ont également été incriminées dans plusieurs maladies auto-immunes humaines (pour revue, (Maddur, Miossec, Kaveri, & Bayry, 2012)).

Ces observations mettent en évidence une fonction pro-inflammatoire des cellules Th17 de la muqueuse intestinale qui semble être protectrice, à condition que leur nombre soit maintenu à l'équilibre avec les cellules Treg.

En outre, les lymphocytes Th17 jouent également un rôle sur le renouvellement de la barrière intestinale, via la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 qui se lient à leur récepteur présents à la surface des cellules épithéliales de la muqueuse (Kinugasa, Sakaguchi, Gu, & Reinecker, 2000). De plus, chez la souris, l'IL-17 stimule les cellules épithéliales pour la production de peptides anti-microbiens (Liang et al., 2006). Il est bien décrit que les lymphocytes T CD8⁺ de la muqueuse produisent également de l'IL-17 et récemment d'autres populations cellulaires ont été identifiées, qui seraient capables de sécréter ces cytokines comme les LT_i, les ILC ou encore les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Hammerich & Tacke, 2014), (P. Kumar, Rajasekaran, Palmer, Thakar, & Malarkannan, 2013), (Mizuno et al., 2014).

Les souris « germ-free » élevées dès la naissance en conditions stériles permettent de contrôler expérimentalement leur microbiote. Les cellules Th17 seraient absentes chez la souris « germ-free » qui semblent toutefois posséder un nombre normal de cellules T intestinales ; après colonisation par une flore microbienne complexe contenant bactéries commensales et pathogènes, les cellules Th17 sont alors retrouvées en nombre abondant (Ivanov et al., 2008). De plus, l'apport d'un unique type de bactérie a permis de mettre en évidence des réponses cytokiniques spécifiques d'un type bactérien donné (Lochner et al., 2011). Ainsi, la génération des cellules Th17 et leur fonction dans la muqueuse intestinale seraient contrôlées par les bactéries commensales. Même s'il semble difficile d'extrapoler ces découvertes à l'Homme et son richissime et complexe microbiote, la composition de la flore microbienne participe certainement à la régulation des réponses T de la muqueuse.

c. Lymphocytes T double positifs

Chez le macaque rhésus, une sous-population de lymphocytes T exprimant à la fois CD4 et CD8 a été identifiée dans la lamina propria, dont 80% sont des TEM hautement activées exprimant fortement la molécule du CMH de classe II (Mamula-DR chez le macaque) et CCR5 et auraient une capacité effectrice supérieure aux lymphocytes T CD4⁺ simples positifs, en terme de production de cytokines (Macchia, Gauduin, Kaur, & Johnson, 2006) et (Pahar et al., 2006). En périphérie cette population CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ est également retrouvée chez l'Homme même si elle représente un plus faible pourcentage que dans la circulation sanguine des primates (Magalhaes et al., n.d.).

Les surfaces muqueuses au carrefour entre antigènes alimentaires et bactéries commensales nécessitent un système immunitaire finement régulé. Une réponse pro-inflammatoire excessive peut avoir des conséquences dévastatrices sur l'intégrité de la muqueuse. D'une manière générale, le déclenchement, le maintien et la résolution des réponses innées et adaptatives de la muqueuse dépendent de la migration des cellules immunitaires. Le recrutement des lymphocytes T vers le GALT (ou « homing ») joue ainsi un rôle prépondérant dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse.

C. Recrutement des lymphocytes T à la muqueuse intestinale

1. Principes généraux

L'immunité adaptative du GALT débute lorsque les cellules dendritiques migrent jusqu'aux zones T des ganglions mésentériques, plaques de Peyer ou ILFs pour y présenter les peptides antigéniques associés au CMH (Everson et al., 1996). La plupart du temps, les lymphocytes T naïfs ne rencontrent pas leur antigène spécifique présenté par les cellules dendritiques et quittent les sites inducteurs du GALT pour retourner dans le sang périphérique via les vaisseaux lymphatiques efférents (Mackay et al., 1990). Si la reconnaissance antigénique a lieu, après activation, les lymphocytes T issus des sites inducteurs du GALT reçoivent une « empreinte de migration » spécifique qui restreint leur interaction avec les molécules d'adhésion de la muqueuse (**Figure 11** et chapitre 2.c.ii)). Au contraire, la localisation des IEL au CD8 α serait indépendante d'une activation antigène-spécifique au sein des sites inducteurs (S. H. Park et al., 1999), (Gapin, Cheroutre, & Kronenberg, 1999).

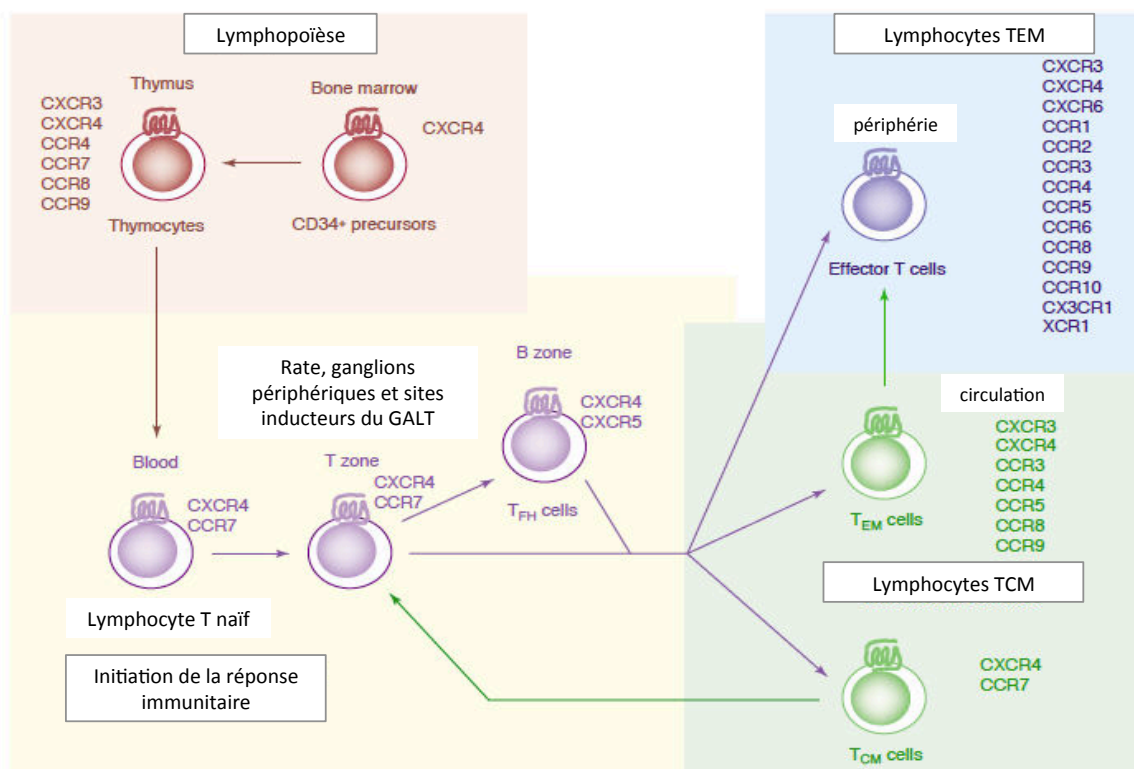


Figure 11 : Schéma général de l'évolution des propriétés migratoires des lymphocytes T. Les lymphocytes T acquièrent des profils de migration différents illustrés ici par l'expression des récepteurs aux chimiokines. Les changements majoritaires surviennent lors de la lymphopoïèse, pendant l'initiation de la réponse et la génération des lymphocytes TCM et TEM.

D'après (Moser et al., 2004)

2. Principales molécules impliquées dans la circulation des lymphocytes T vers la muqueuse intestinale

Tout lymphocyte circulant entre dans les tissus via des veinules post-capillaires à endothélium cubique ou HEV (pour « High Endothelial Venules »). Ce processus appelé cascade d'adhésion débute classiquement par le roulement de la cellule sur l'endothélium des HEV, se poursuit par son activation et son adhésion pour finir par la transmigration de la cellule dans le tissu adjacent et sa localisation dans son nouveau micro-environnement (Steeber & Tedder, 2000) (Springer, 1994). Ces étapes sont finement coordonnées par les molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour « Cell Adhesion Molecule ») et les chimiokines (Bargatze, Jutila, & Butcher, 1995), (C. Weber, 2007) et (**Figure 12**).

a. Les molécules d'adhésion cellulaires (CAM)

i) Généralités

Les molécules d'adhésion cellulaires sont classiquement divisées en trois grandes familles : les sélectines, les intégrines et des membres de la superfamille des immunoglobulines (Lasky, 1994). La contribution précise de chaque molécule dans l'adhérence des lymphocytes T dépend du tissu regardé et de son état d'inflammation mais, de façon générale, chaque CAM agit en se fixant à son ligand spécifique exprimé en surface des cellules endothéliales du tissu ((Steeber & Tedder, 2000) et **Figure 12**).

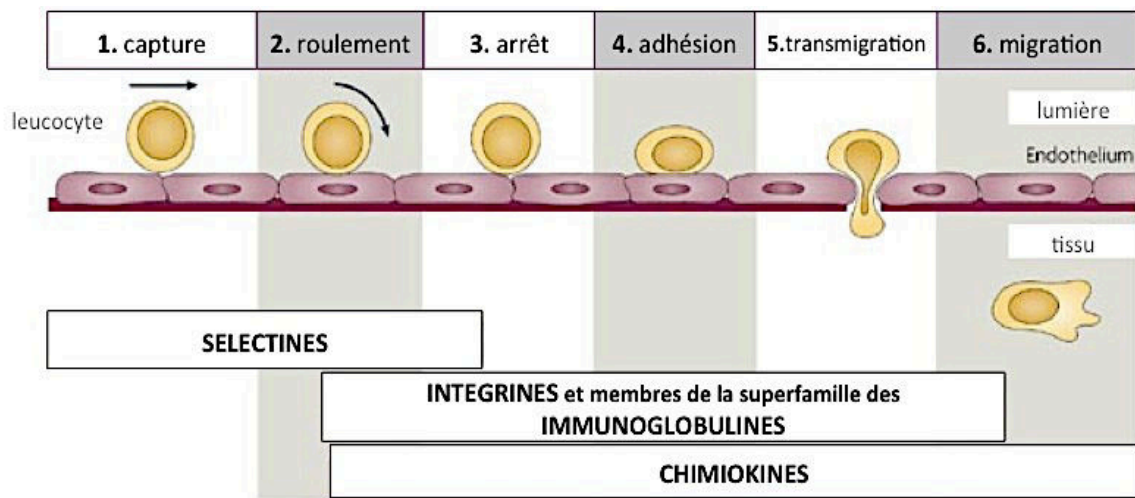


Figure 12 : Principales étapes de la cascade d'adhésion.

L'entrée des cellules immunitaires circulantes dans les tissus est un processus finement coordonné par les molécules d'adhésion cellulaires (CAM). L'interaction séquentielle des CAM en surface des cellules circulantes et des cellules endothéliales des HEV permet aux cellules de s'attacher (capture) à l'endothélium sous l'action des sélectines et rouler à sa surface (roulement). Puis les cellules adhèrent stablement à l'endothélium (arrêt et adhésion) grâce aux intégrines et à certains membres de la superfamille des immunoglobulines afin de migrer à travers celui-ci (transmigration) sous l'action de chimiokines. Finalement, les cellules suivent le gradient chimiotactique qui permettra leur localisation dans différents sous-compartiments tissulaires.

D'après C.Weber et al, 2007

ii) La L-sélectine

Les sélectines sont des glycoprotéines dont 3 groupes sont retrouvés chez tous les mammifères : les L-sélectines (en surface des leucocytes), les E-sélectines (au niveau des endothélium) et les P-sélectines (endothélium et plaquettes). Les sélectines sont des glycoprotéines et possèdent toutes un domaine de liaison aux sucres («CRD pour Carbohydrate Recognition Domain») (Zarbock, Ley, McEver, & Hidalgo, 2011). En surface des lymphocytes T naïfs, la L-sélectine (CD62 ligand ou CD62L) facilite leur interaction avec les cellules endothéliales activées, permettant le roulement ralenti contre la paroi des HEV au niveau de tous les ganglions lymphatiques périphériques, plaques de Peyer et ILFs (Bargatze et al., 1995), (Ley & Kansas, 2004) et (Figure 12).

L'étape suivante d'adhésion à l'endothélium est médiée principalement par les chimiokines et les intégrines. Mes travaux se sont concentrés sur l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ et les chimiokines importantes pour la migration des lymphocytes T vers la muqueuse intestinale.

iii) L'intégrine $\alpha_4\beta_7$

Les intégrines sont des hétérodimères composées d'une chaîne α et une chaîne β ; on compte aujourd'hui plus de 20 intégrines selon la forme de chaque chaîne (Hynes, 2002). En surface des cellules endothéliales, les ligands des intégrines sont des récepteurs d'adhésion appartenant à la super famille des immunoglobulines. L'intégrine $\alpha_4\beta_7$ est exprimée constitutivement par les lymphocytes T (et B) naïfs à un niveau relativement bas à intermédiaire ($\alpha_4\beta_7^{\text{int}}$), (Erle et al., 1994). Son expression est augmentée fortement en surface d'une sous-population de lymphocytes T mémoires ($\alpha_4\beta_7^{\text{hi}}$) au tropisme muqueux alors que la majorité des lymphocytes T mémoires qui ne circulent pas vers l'intestin n'exprime pas $\alpha_4\beta_7$ (Schweighoffer et al., 1993).

L'adhésion des lymphocytes T naïfs et effecteurs/mémoires aux HEV du GALT et aux vaisseaux de la lamina propria requiert la liaison de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ du lymphocyte à son ligand endothélial MadCAM-1 (pour « Mucosal adressin Cell Adhesion Molecule »). L'affinité de la liaison $\alpha_4\beta_7$ / MadCAM-1 est d'abord faible puis, sous l'action des chimiokines, va augmenter pour permettre l'arrêt complet de la cellule (Campbell, 1998) (Alon & Feigelson, 2009) et

Chez l'Homme, la protéine MadCAM-1 est exprimée constitutivement au niveau des HEV des ganglions mésentériques, plaques de Peyer, ILFs et au niveau des vaisseaux de la lamina propria de l'intestin grêle et du colon. Elle est également retrouvée chez l'Homme au niveau du thymus, des amygdales ou bien encore du cerveau (Briskin et al., 1997). Chez la souris, sa contribution dans le recrutement des lymphocytes T $\alpha 4\beta 7^+$ aux ganglions mésentériques semble moindre alors que c'est la CAM majoritaire au niveau des HEV des follicules et plaques de Peyer (Wagner et al., 1996).

Si les CAM sont absolument requises pour les premières étapes du processus de homing, les chimiokines sont les molécules clés qui orchestrent la migration des cellules circulantes à travers les HEV et jusqu'au tissu adjacent.

b. Les chimiokines

i) Généralités sur la superfamille des chimiokines

Les chimiokines sont des petites cytokines basiques sécrétées de 8 à 14kDa aux propriétés chimio-attractantes. Leur conservation au cours de l'évolution rend compte de leur importance biologique (DeVries et al., 2005). Outre leur fonction dans la maturation et la coordination des migrations leucocytaires, elles jouent des rôles cruciaux dans la biologie de la reproduction (Hannan, Jones, White, & Salamonsen, 2006), l'organogénèse (McGrath, Koniski, Maltby, McGann, & Palis, 1999) et l'hématopoïèse (Broxmeyer, 2008). Les chimiokines sont également essentielles au processus d'angiogénèse, normale ou tumorale en induisant des effets à la fois pro- et anti- angiogéniques (revues par (Bosisio, Salvi, Gagliostro, & Sozzani, 2014)).

• Classification des chimiokines

Les chimiokines ont une structure unique et conservée qui a permis la détection in silico de motifs caractéristiques. Quatre groupes de chimiokines (CC, CXC, CX3C et C) ont été définis récemment en fonction de la localisation et du nombre de résidus cystéines conservés à l'extrémité N-terminale de la protéine mature (Zlotnik & Yoshie, 2000). Une répartition en deux groupes distincts, fondée sur leurs propriétés « fonctionnelles » est parfois proposée et distingue les chimiokines homéostatiques produites constitutivement dans les tissus des chimiokines inflammatoires induites en réponse aux stress.

Toutefois, leur appartenance à l'un des deux groupes n'est pas exclusive puisque certaines chimiokines classées comme inflammatoires sont exprimées au cours de processus physiologiques. Inversement, l'expression de certaines chimiokines dites homéostatiques est augmentée en réponse à certains facteurs de stress. Par exemple CCL25 (TECK pour « Thymus-Expressed Chemokine »), notamment produite par les cellules épithéliales intestinales (Bowman et al., 2002), est surexprimée par ces mêmes cellules dans les parties inflammées de l'intestin grêle chez les patients atteints par la maladie de Crohn (Papadakis et al., 2003).

Aujourd'hui, plus de 40 chimiokines ont été décrites chez l'Homme et la souris pour plus de 20 récepteurs connus (**Figure 13**). *In vivo*, une chimiokine donnée lierait donc plusieurs récepteurs exprimés par différents types cellulaires, et inversement, un récepteur de chimiokine peut fixer plusieurs ligands. La spécificité d'action des chimiokines serait directement liée à leur site de production et leur niveau d'expression et à la distribution cellulaire de leur(s) récepteur(s) cible(s) (Kieda, 2003).

• Récepteurs aux chimiokines et signalisation

La majorité des récepteurs aux chimiokines caractérisés à ce jour font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques et activent les voies de signalisation de la PI3K (« Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase ») et des MAPK (« Mitogen-activated protein kinases »). Le type et le nombre de voies induites par la fixation du ligand à son récepteur dépendent de la nature de la chimiokine, de la cellule cible et du micro-environnement cytokinique de celle-ci.

D'autres récepteurs aux chimiokines atypiques, nommés récemment les ACKR pour « Atypical ChemoKine Receptors », sont également des protéines à sept domaines transmembranaires mais qui ne sont pas couplés aux protéines G hétérotrimériques, ce qui leur confère des rôles différents qui continuent d'être découverts ((Bachelier et al., 2013) et **Figure 13**). Par exemple, il a récemment été montré que l'internalisation et la séquestration de la chimiokine CCL21 de façon très localisée par le récepteur atypique ACKR4 (CCRL1) permet la mise en place d'un gradient de cette chimiokine au niveau du sinus sous-capsulaire des ganglions lymphatiques chez la souris (Ulvmar et al., 2014).

Un autre exemple tout aussi intéressant est illustré par le récepteur ACKR1 (ou DARC pour « Duffy antigen/receptor for chemokines ») exprimé à la surface des érythrocytes. Ce récepteur est décrit comme pouvant adsorber les chimiokines plasmatiques, agissant comme un « puits » régulant le niveau sanguin de nombreuses chimiokines (Rot, 2005). Loin d'être des « récepteurs silencieux », les récepteurs atypiques contribuent tous de différentes façons à la régulation fine de la localisation micro-anatomique et l'abondance des chimiokines (Bachelier et al., 2014).

De nombreux essais thérapeutiques ont été et sont menés afin de cibler les récepteurs aux chimiokines dans de nombreuses pathologies inflammatoires et cancéreuses ; aujourd'hui seulement deux molécules ciblant soit CCR5 soit CXCR4 sont commercialisées (Bachelier et al., 2013).

Récepteurs atypiques

Distribution Nom

CHIMIOKINES

Récepteurs couplés aux protéines G

Nom Distribution

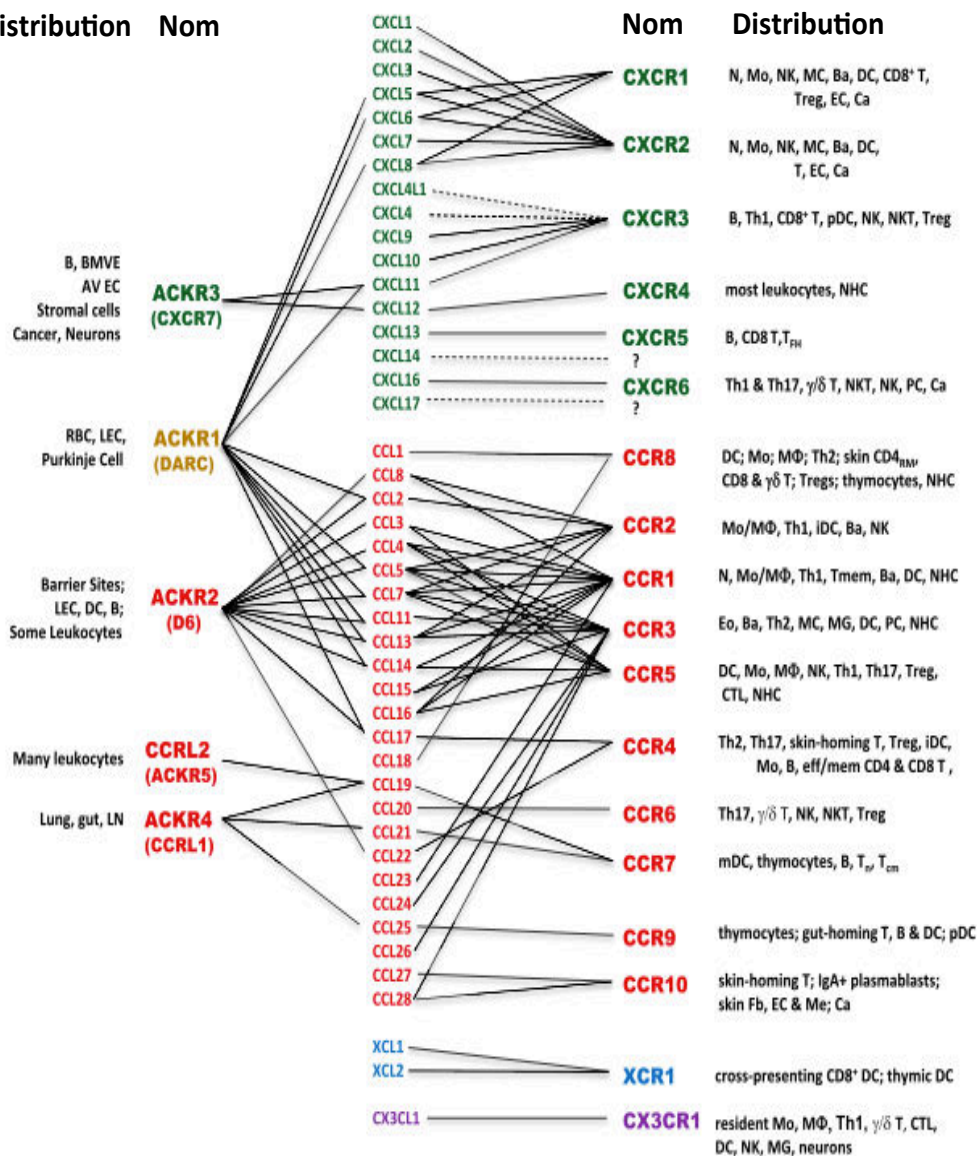


Figure 13 : Chimioamines et récepteurs spécifiques

Ba : basophiles, Ca : cancer, CD4_{RM} : lymphocyte T mémoire résidant, EC : cellule endothéliale, Eo : éosinophile, Fb : fibroblaste, iDC : cellule dendritique immature, MC : mastocyte, Me : mélanocyte, MG : cellule microglicale, Mo : monocyte, M Φ : macrophage, N : neutrophile, NHC : cellule non hématopoïétique, PC : plasmocyte, pDC : cellule dendritique plasmacytoïde, T_{CM} : lymphocyte T central mémoire, Th1 : lymphocyte T helper de type1, TN : lymphocyte T naïf, thym : thymocytes
D'après (Bachelier et al., 2013)

• Autres mécanismes de régulation de l'activité des chimiokines

La biodisponibilité des chimiokines dépend en premier lieu de leur expression spatiale et temporelle. En règle générale, l'ARNm codant pour les chimiokines, en particulier les chimiokines induites lors de processus inflammatoires, est instable et soumis à la dégradation. Cependant, certains stimuli pro-inflammatoires tels que le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IFN-}\gamma$, l'IL-10 ou bien encore le LPS bactérien augmentent la stabilité de l'ARNm dans un type cellulaire donné *in vitro* (R. Biswas et al., 2003), (Kawka et al., 2014), (Cassatella et al., 1997). Les voies de signalisation impliquées dans la stabilisation de l'ARNm des chimiokines font l'objet d'investigations récentes (J. Fan et al., 2011). Par ailleurs, chez la souris, la transcription de la séquence codant pour CCL27 aboutit à deux variants d'épissage : l'un abouti à une protéine sécrétée (ESkine) tandis que la seconde protéine (PESKY) est transloquée au noyau pour réguler l'expression de gènes cibles (Baird et al., 1999).

De nombreux mécanismes de régulation fine interviennent aussi au niveau post-traductionnel, dont la liaison des protéines aux GAG (GlycosAminoGlycanes) des matrices extracellulaires (Palframan et al., 2001). Les GAG sont des polysaccharides qui se présentent sous forme soluble (comme l'héparine) ou liée à la membrane cellulaire (c'est le cas des héparanes sulfates). Ils interagissent avec de nombreuses protéines dont les chimiokines qu'ils protègeraient de la dégradation (Sadir, Imberty, Baleux, & Lortat-Jacob, 2004). De façon intéressante, des variants mutants de chimiokines incapables de lier les GAG n'induisent plus de recrutement cellulaire *in vivo* alors que ces variants conservent leurs propriétés chimiotactiques *in vitro* (Proudfoot et al., 2003). Ainsi l'interaction de ces protéines avec les GAG joue un rôle majeur dans la fonction des chimiokines *in vivo*. Cette étude a également révélé la présence d'oligomères de chimiokines, indiquant que l'oligomérisation de celles-ci serait un niveau supplémentaire de régulation.

Souvent produites ensemble, les chimiokines peuvent soit agir en synergie pour attirer les cellules cibles (Gouwy, Struyf, Proost, & Van Damme, 2005) soit s'antagoniser pour réduire la réponse inflammatoire ou augmenter la spécificité de leur action sur un type cellulaire ciblé. Par exemple, les ligands de CXCR3 attireraient les lymphocytes Th1 via leur liaison à ce récepteur tout en bloquant simultanément la migration des lymphocytes de type Th2 en réponse aux ligands de CCR3 (Xanthou, Duchesnes, Williams, & Pease, 2003). Ainsi, la capacité d'une chimiokine à recruter un type cellulaire donné dépend aussi de la nature des chimiokines co-produites.

Finalement, l'activité de nombreuses chimiokines est aussi régulée par clivage protéolytique impliquant des protéases, particulièrement abondantes sur le site de l'inflammation (Mortier, Gouwy, Van Damme, & Proost, 2011). Ce mécanisme de régulation est particulièrement étudié concernant la chimiokine CCL5 (RANTES pour « Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted ») dans le contexte de l'infection par le VIH-1. Ainsi, le clivage protéolytique de CCL5 au site N-terminal de la protéine affaiblit sa capacité de liaison aux récepteurs CCR1 et CCR3 alors que la liaison et la signalisation via CCR5 sont augmentées, ce qui générerait un agoniste plus efficace de CCR5 pour inhiber l'infection par le virus (Proost et al., 1998). Quelques chimiokines sont également modifiées par glycosylation comme CCL2, CCL5, CCL11, CCL5 et CCL14 ainsi que XCL1 et CX3CL1 (Mortier et al., 2011) ou bien encore par citrullination (conversion d'un acide aminé arginine en citrulline) (Proost et al., 2008).

ii) Mécanisme d'action des chimiokines dans la cascade d'adhésion

Il est établi que les chimiokines sont synthétisées par de nombreux types cellulaires dans les tissus sous jacents à l'endothélium, puis traversent les cellules endothéliales par diffusion pour être présentées via les HSGAGs (HS pour « Heparan Sulfate ») en surface des cellules endothéliales des HEV adjacents ; elles stimulent ainsi l'activation des intégrines permettant l'adhésion ferme des cellules circulantes à la paroi des HEV, étape critique à leur migration ultérieure dans les tissus adjacents (K. S. Weber, Klickstein, & Weber, 1999), (Palframan et al., 2001). Chez la souris, le récepteur atypique DARC serait responsable du transport actif des chimiokines à travers l'endothélium pour leur présentation à la partie apicale des cellules endothéliales ((Pruenster et al., 2009) et **Figure 14**).

De façon contradictoire, une étude récente a montré que les cellules endothéliales guideraient la migration des lymphocytes à partir de chimiokines contenues dans des vésicules intracellulaires plutôt que par une présentation en surface de « dépôts » de chimiokines. Ces vésicules semblent liées au réseau d'actine cellulaire immédiatement sous la membrane plasmique et libèreraient leur contenu à des points très précis de contact avec les protrusions du lymphocyte (Shulman et al., 2011).

De façon assez surprenante, des processus de transmigration (passage au travers d'une cellule) des leucocytes ont également été observé *in vitro* (Engelhardt & Wolburg, 2004).

In vitro, de nombreuses chimiokines sont sécrétées directement par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques de façon régulée par les signaux inflammatoires.

Par exemple, le LPS bactérien induit l'expression de CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3 α) et CXCL3 (GRO- γ) par les cellules endothéliales lymphatiques (LEC pour « Lymphatic Endothelial Cells ») (Sawa & Tsuruga, 2008). Chez l'Homme, CCL21 est également exprimé par les endothéliums lymphatiques et périvasculaires (Carlsen, Haraldsen, Brandtzaeg, & Baekkevold, 2005). De façon intéressante, la stimulation par l'interféron de type 1 produit lors d'infections virales induit également la sécrétion des chimiokines CCL5 et CX3CL1 (Fractalkine) par les cellules endothéliales micro-vasculaires du poumon (Nakano et al., 2012).

Les chimiokines semblent également être directement sécrétées *in vivo* par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques (Mancardi et al., 2003).

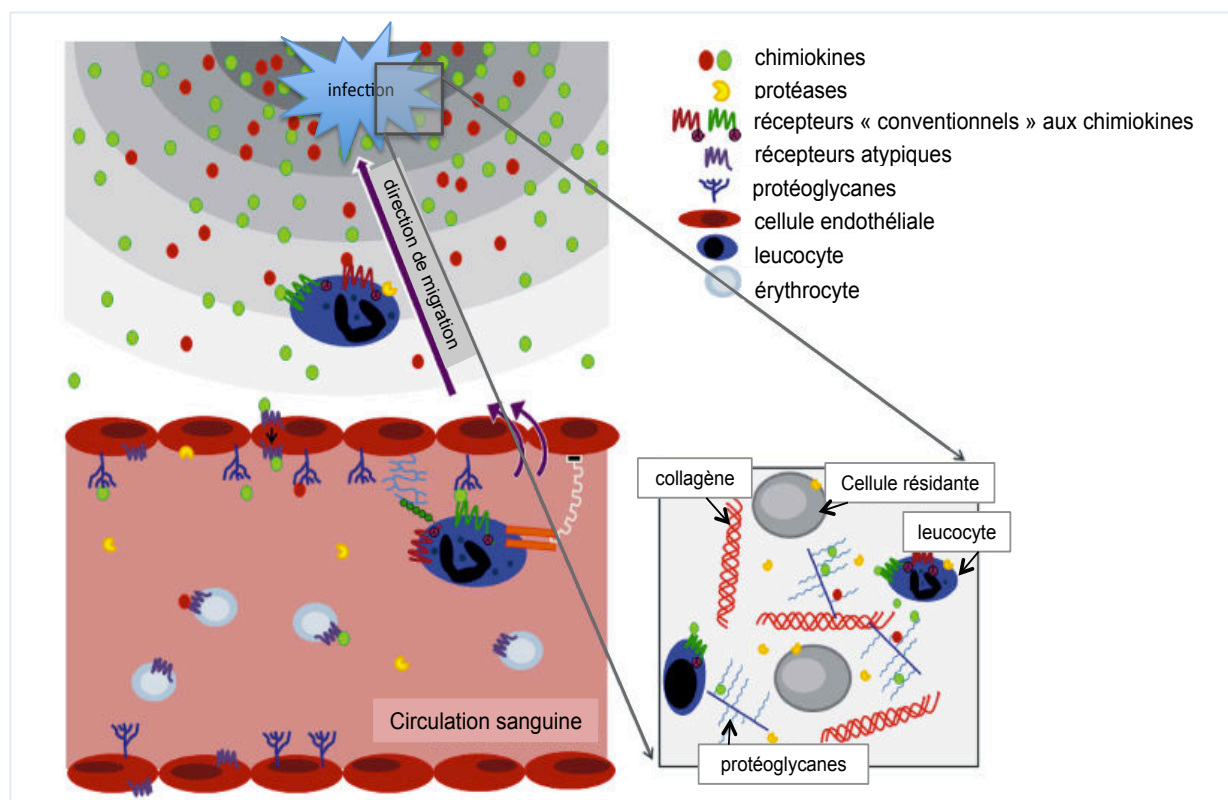


Figure 14 : Les principaux systèmes de contrôle de l'activité des chimiokines.

Les chimiokines sont produites au site de l'infection par les cellules du tissu. En se fixant aux GAG des protéoglycane de la matrice extracellulaire, ces chimiokines forment un gradient de concentration. Les chimiokines traversent la barrière endothéliale par diffusion ou via un processus actif médié par les GAG (et probablement par DARC) et sont présentées aux leucocytes circulants. En coopération avec des molécules d'adhésion et des protéases, ces chimiokines induisent l'extravasation des leucocytes et les guident à travers la matrice extracellulaire jusqu'au site d'infection.

iii) Mécanisme d'action des chimiokines pour la migration intra-tissulaire

Cette étape fait intervenir également les HSGAGs qui mettent en place un gradient de concentration de chimiokines guidant la cellule cible (T. Jin, Xu, & Hereld, 2008). Le mécanisme par lequel le gradient est établi a été mis en évidence pour la première fois *in vivo* chez le poisson zèbre (*danio rerio*) et implique la séquestration des chimiokines par les protéoglycane sulfatées de la matrice extra-cellulaire, souvent associées au collagène du tissu (Sarris et al., 2012) et **Figure 14**. Nous avons vu précédemment que les récepteurs atypiques, en séquestrant et en internalisant leur(s) ligand(s), permettent la mise en place de gradients de concentration très localisés, comme cela a pu être illustré dans les ganglions lymphatiques chez la souris (Ulvmar et al., 2014). Ces récepteurs atypiques participent aussi très certainement à la mise en place du gradient de concentration de chimiokines chez l'Homme.

c. Principales chimiokines responsables de la migration des lymphocytes T vers l'intestin grêle

Après avoir détaillé les mécanismes généraux d'action des chimiokines sur le recrutement des lymphocytes, nous nous intéresserons plus particulièrement aux chimiokines dirigeant la migration des lymphocytes T dans le GALT.

i) Chimiokines impliquées dans la circulation des lymphocytes naïfs

Les cellules stromales des ganglions périphériques et des plaques de Peyer sécrètent les chimiokines CCL19 (MIP-3 β ou ELC) et CCL21 (SLC) qui se lient aux HEV (Sallusto et al., 1999), (Warnock et al., 2000). Les cellules CCR7⁺, récepteur commun aux deux chimiokines migrent donc de manière homogène vers les ganglions périphériques et les sites inducteurs du GALT. L'expression de CCR7 par les cellules T naïves de l'Homme et des PNH est bien documentée de même que CXCR4 qui a fait l'objet de nombreuses publications en tant que corécepteur au VIH-1. C'est ainsi que l'expression de ce dernier a été décrite en surface des lymphocytes T naïfs chez l'Homme (Bleul et al., 1997). Son ligand CXCL12 (SDF-1) est également exprimé par les cellules épithéliales de l'intestin grêle (Dotan et al., 2010), au niveau des HEV des ganglions et des plaques de Peyer (et par extension probablement des ILFs) et agirait en synergie avec les deux chimiokines précédentes pour promouvoir le recrutement des cellules T naïves CXCR4⁺ CCR7⁺ (Bai et al., 2009).

Comme décrit dessus, il est établi que les lymphocytes naïfs ne migrent pas dans les tissus extra-lymphoïdes. De façon intéressante et contradictoire avec ce paradigme, il a été rapporté chez la souris que les lymphocytes T CD8⁺ récemment émigrés du thymus, les RTE (« Recent Thymic Emigrants ») ainsi qu'un nombre substantiel de lymphocytes T naïfs CD4⁺ et CD8⁺ migreraient de façon constitutive vers la lamina propria de l'intestin grêle. Ces migrations semblent dépendantes de la chimiokine CCL25 et de l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ (Staton et al., 2006), (Cose, Brammer, Khanna, Masopust, & Lefrançois, 2006).

ii) Rôle des cellules dendritiques dans la migration des lymphocytes T activés

En règle générale, l'induction des récepteurs aux chimiokines permettant l'entrée dans le tissu cible est associé au ganglion ou tissu lymphoïde dans lequel a eu lieu la rencontre avec l'antigène spécifique (CAMPBELL & BUTCHER, 2002). Différentes populations de cellules dendritiques (DC pour « Dendritic Cells ») sont présentes au niveau des sites inducteurs et des sites effecteurs de l'intestin et capturent les antigènes par des mécanismes différents. La grande majorité de nos connaissances des sous-populations de DC de la muqueuse intestinale *in vivo* provient de modèles murins transgéniques. Ainsi un modèle de souris CX3CR1-GFP a permis la mise en évidence, au niveau des plaques de Peyer, d'une sous-population de DC CX3CR1⁺ dont la particularité est la projection de dendrites vers la lumière intestinale pour y capturer des antigènes particuliers. Elles seraient plus nombreuses au niveau du duodénum et du jéjunum que dans l'iléon, à l'état basal (Niess, 2005).

Plus profondément dans la lamina propria, une population de DC matures exprimant fortement le CMH de classe II est caractérisée par l'expression de l'intégrine CD103 chez la souris et l'Homme. Les DC CD103⁺ de la lamina propria sont très efficaces *in vitro* pour activer les lymphocytes T et migrent activement vers les ganglions mésentériques après stimulation *in vivo* (Schulz et al., 2009). Au niveau des sites inducteurs de l'intestin grêle et des ganglions mésentériques, les DC CD103⁺ murines induisent la forte expression du récepteur de homing intestinal CCR9 et de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ en surface des lymphocytes T CD4 et CD8 activées (Stagg, Kamm, & Knight, 2002). Ce mécanisme est dépendant de l'acide rétinoïque, métabolite de la vitamine A synthétisé par les cellules CD103⁺ elles-mêmes ou directement présent dans leur microenvironnement.

Dans l'intestin grêle des souris, les DC de la lamina propria stimulent également *de novo* la différenciation des lymphocytes T en T régulateurs (Treg) en présence de TGF β et d'acide rétinoïque (C. M. Sun et al., 2007).

Bien que l'écrasante majorité des travaux proviennent de modèles murins, les propriétés uniques des DC CD103⁺ de l'intestin grêle semblent conservées chez l'Homme (Jaensson et al., 2008).

iii) Principales chimiokines impliquées dans le recrutement ciblé des lymphocytes T activés vers la lamina propria de l'intestin grêle

• La chimiokine CCL25

C'est la chimiokine la plus extensivement décrite dans le recrutement des lymphocytes T activés vers la muqueuse de l'intestin grêle. Chez l'Homme, l'ARNm codant CCL25 est constitutivement et fortement exprimée par les cellules épithéliales des cryptes et des villosités de l'intestin grêle ((Papadakis et al., 2003) et **Figure 15**). Il est à noter qu'à l'état basal CCL25 n'est pas produite, ou que très faiblement, au niveau du gros intestin (Kunkel et al., 2000), (Papadakis et al., 2000). La protéine CCL25 est aussi retrouvée en surface des cellules endothéliales de la lamina propria de l'intestin grêle (Butcher, Williams, Youngman, Rott, & Briskin, 1999). Ce profil d'expression induit donc l'adressage spécifique et localisé des lymphocytes T activés CCR9⁺ dans la lamina propria de l'intestin grêle. En périphérie, ce récepteur est retrouvé en surface d'une sous-population de cellules T qui co-exprime également la chaîne $\beta 7$ à un niveau élevé, suggérant fortement que ces lymphocytes T CCR9⁺ $\beta 7^{\text{hi}}$ sont destinés à migrer exclusivement vers l'intestin grêle. Dans la lamina propria saine, il est décrit que la majorité des cellules orientées Th1 ou Treg sont CCR9⁺ (Papadakis et al., 2003)

Par ailleurs, la production ectopique induite de CCL25 semble impliquée dans des pathologies diverses touchant notamment le foie qui se caractérisent par l'infiltration anormale de lymphocytes CCR9⁺ activés (Eksteen, 2004). Cette production ectopique de CCL25 pourrait être responsable de manifestations inflammatoires de la peau ou des articulations touchant les patients atteints d'IBD (revue par (Adams & Eksteen, 2006)).

• La chimiokine CCL20

Une grande partie des cellules CD4⁺ de la lamina propria de l'intestin grêle sont de type Th17. Or, toutes les cellules sécrétrices d'IL-17 exprimeraient le récepteur CCR6, ce qui leur confère donc la capacité de lier la chimiokine CCL20 (Singh, Zhang, Foley, Hedrick, & Farber, 2008). Chez l'Homme et la souris, celle-ci est produite constitutivement par les cellules épithéliales du colon et de l'intestin grêle et à plus haut niveau par l'épithélium associé aux follicules isolés (FAE pour « follicule associated epithelium ») et aux plaques de Peyer ((Anderle et al., 2005) et **Figure 15**).

De façon intéressante, la sécrétion induite de CCL20 chez la souris stimulerait le recrutement massif des cellules Th17 CCR6⁺, préférentiellement dans l'intestin grêle proximal par rapport au colon (Esplugues et al., 2011).

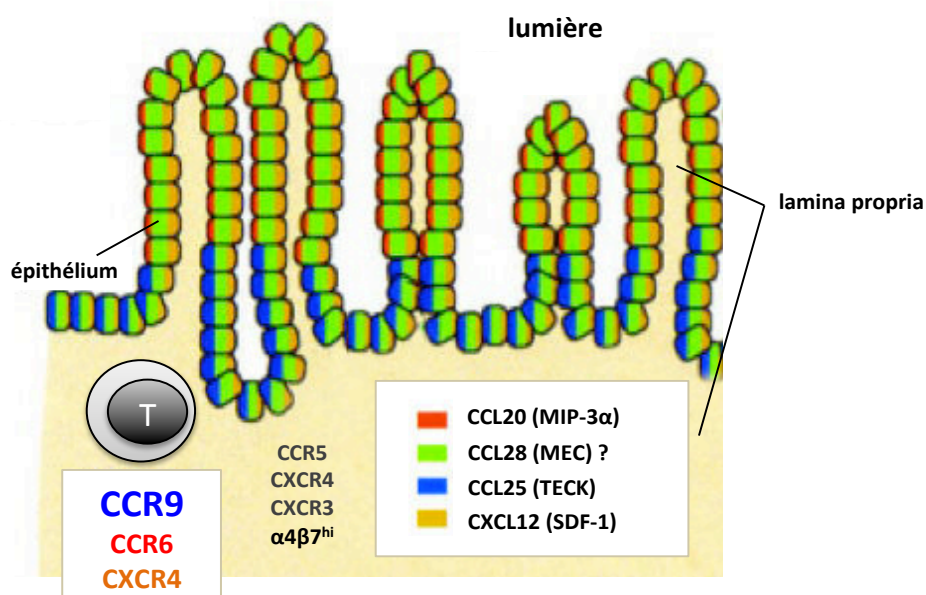


Figure 15 : Chimiokines produites constitutivement par les cellules épithéliales de l'intestin grêle et leur récepteur en surface des lymphocytes T de la lamina propria.

CCL25 est abondamment sécrétée par les cellules épithéliales à la partie basale des villi tandis que CCL20 serait plutôt produite à la partie apicale. CXCL12 semble produite de façon homogène par les cellules épithéliales. La chimiokine CCL28 permettrait le recrutement des lymphocytes T et B CCR10⁺. Les lymphocytes T activés de la lamina propria expriment aussi CCR5, CXCR4 et CXCR3.

Les LPL sont caractérisés par l'expression forte de $\beta 7$ ($\beta 7^{\text{hi}}$).

D'après (KUNKEL, CAMPBELL, & BUTCHER, 2003)

De nombreuses chimiokines sont décrites sporadiquement comme étant exprimées dans la muqueuse de l'intestin grêle, saine ou inflammatoire. Leur mise en jeu dans le recrutement basal ou pathologique des lymphocytes T exprimant le récepteur adéquat est donc tout à fait envisageable. Mes travaux se sont concentrés sur l'expression des chimiokines listées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**). Les chimiokines CXCL12 et CCL28 (MEC pour « Mucosa-associated Epithelial chemokine ») apparaissent également sur la **Figure 15**.

Nom systématique	Nom courant	cellules cibles connues
CCL2	MCP-1	T , Mo, MΦ, NK, iDC, B, Ba
CCL3	MIP-1α	T , Mo, MΦ, NK, iDC, Ba, Eo
CCL5	RANTES	T , Mo, MΦ, NK, iDC, Ba
CCL19	MIP-3β	T , B, mDC
CCL21	SLC	T , B, mDC
CCL25	TECK	Thy, T , iDC
CCL28	MEC	T , Eo, B, iDC
CXCL10	IP-10	T , B, NK, DC, MΦ
CXCL12	SDF-1	T , Mo, B, iDC

Tableau 1 : Liste des chimiokines détectées dans l'intestin grêle chez l'Homme et la souris et impliquées dans le recrutement des lymphocytes T.

T : lymphocytes T, Mo : monocytes, MΦ : macrophages, NK : natural killer, iDC : cellules dendritiques immatures, Ba : basophiles, B : lymphocytes B, Eo : éosinophiles, mDC : cellules dendritiques matures, Thy : thymocytes. D'après (Rancez, Couëdel-Courteille, & Cheynier, 2012)

d. Un mot sur les chimiokines CXCL10 et CCL2

De nombreuses études ont montré l'implication de CXCL10 (ou IP-10 pour « IFN-gamma-inducible protein-10 ») dont la sécrétion est induite dans les processus inflammatoires par de nombreuses cellules du système immunitaire et par des cellules stromales. CXCL10 lie le récepteur CXCR3 exprimé majoritairement par les cellules T activées, les lymphocytes B, les NK, les DC et les macrophages (M. Loetscher et al., 1996), (Sallusto, Lenig, Mackay, & Lanzavecchia, 1998).

Des niveaux anormaux de CXCL10 ont été détectés dans les fluides corporels de patients infectés par des virus, bactéries, champignons et parasites (Armah et al., 2007), (Dyer, Percopo, Fischer, Gabryszewski, & Rosenberg, 2009), (Brownell et al., 2014). Par conséquent, CXCL10 doit jouer un rôle crucial dans la pathogénèse de nombreuses maladies. Son rôle dans l'infection par le VIH-1 n'est pas encore bien compris. La quantité de CXCL10 plasmatique reflèterait la charge virale du liquide céphalorachidien des individus infectés (Cinque et al., 2005). De plus, le niveau d'IP-10 dans le tractus génital féminin semble aussi refléter la charge virale vaginale (Blish et al., 2012). La quantité de CXCL10 plasmatique a été récemment corrélée avec la charge virale et pourrait donc être un marqueur pronostic de la virémie (Gray et al., 2013) et de la progression de la pathologie (Liovat et al., 2012).

L'implication de la chimiokine CCL2 dans le recrutement des lymphocytes T activés est rarement décrite. Toutefois, une publication suggère que les lymphocytes T CD4⁺ CCR2⁺ migrent préférentiellement vers la lamina propria de l'iléon des patients atteints de la maladie de Crohn, probablement en réponse à une surexpression de CCL2 par la muqueuse iléale (Connor et al., 2004).

D. Sortie des lymphocytes à partir de l'intestin

La sortie des lymphocytes de la muqueuse intestinale est beaucoup moins décrite que leur entrée. Une étude réalisée chez la souris a récemment mis en évidence *in vivo* d'impressionnants mouvements des cellules myéloïdes et lymphoïdes vers et à partir de la muqueuse intestinale à l'état basal (Morton et al., 2014), suggérant un rôle essentiel des migrations via l'intestin dans l'homéostasie du système immunitaire.

Récemment, un nouvel acteur dans le recrutement des lymphocytes T a été mis en lumière chez le macaque rhésus (Beq et al., 2006). Dans cette étude, l'interleukine-7 (IL-7) injectée à dose pharmacologique à des animaux sains induit la production de chimiokines dans différents organes et notamment l'intestin. Ceci laisse penser que l'IL-7, une cytokine classiquement décrite pour son rôle dans la survie et la prolifération des lymphocytes, jouerait également une fonction importante dans le processus de recrutement des cellules T à la muqueuse via la modification de l'expression de chimiokines.

E. Interleukine-7, homing et immunité muqueuse

1. Développement et homéostasie des lymphocytes T

In vivo, l'étude de souris déficientes pour l'IL-7 ou son récepteur indique que cette cytokine est essentielle au développement et au maintien des cellules T et B (thymus et rates atrophiés, absence de ganglion lymphatique et de plaque de Peyer) (Peschon et al., 1994). Chez l'Homme et les primates non humains un défaut de la voie de signalisation de l'IL-7 aboutit à l'absence du compartiment T uniquement, à l'origine de certaines formes du syndrome SCID (pour « Severe Combined Immunodeficiency »).

L'IL-7 est indispensable à la prolifération, la survie et la maturation des thymocytes conventionnels et probablement des IEL au TCR $\gamma\delta$ (Shitara et al., 2013). En périphérie, l'IL-7 assure la survie et la prolifération homéostatique du compartiment lymphocytaire T naïf et mémoire (Schluns, Kieper, Jameson, & Lefrançois, 2000) (Tan et al., 2001), y compris les lymphocytes Treg (Simonetta et al., 2012), (Younas et al., 2013). En revanche, l'expansion clonale des cellules T activées est sous contrôle de l'IL-2. La prolifération homéostatique des cellules mémoires CD8⁺ est plutôt dépendante de l'IL-15.

Contrairement à la plupart des cytokines dont l'expression est augmentée en conditions inflammatoires, l'IL-7 paraît sécrétée constitutivement, ce qui laisse penser que sa concentration serait majoritairement régulée par sa consommation (J.-H. Park et al., 2004). Cette hypothèse est en accord avec l'observation d'une concentration élevée d'IL-7 plasmatique chez les patients infectés par le VIH-1 en état de lymphopénie CD4⁺ chronique (Sasson et al., 2006). L'IL-7 est en cours d'évaluation en tant qu'immunothérapie chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1 (Lelièvre & Lévy, 2007).

Les effets du traitement utilisant cette cytokine sur le nombre de lymphocytes T circulants et la fonction thymique semblent prometteurs (Levy et al., 2012). Cette thérapie est également évaluée en particulier chez les patients non répondeurs immunologiques (dont le nombre de lymphocytes T CD4⁺ ne remonte pas suffisamment sous traitement malgré une charge virale indétectable).

2. Identification des cellules productrices d'IL-7 grâce aux modèles murins

Les premières études décrivent la production d'IL-7 par les cellules stromales non hématopoïétiques du thymus et de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques et de la rate, des poumons et des intestins, mais également chez l'Homme au niveau du foie et de la peau, en passant par le cerveau et même la prostate (Heufler et al., 1993), (Watanabe et al., 2004), (Schluns et al., 2000), (Golden-Mason et al., 2001), (Moors et al., 2009), (Di Carlo et al., 2009). Pourtant, la distribution des cellules productrices d'IL-7 dans les tissus *in vivo* est longtemps restée méconnue, très certainement du fait de la faible quantité de cytokine produite, rendant délicates les méthodes classiques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie pour sa détection (Mazzucchelli et al., 2009). La construction de nouveaux modèles murins « IL-7 reporter » a permis, entre autres, de confirmer la production d'IL-7 par les cellules épithéliales intestinales mais d'infirmer la production d'IL-7 par les cellules stromales de la rate (pour revue sur ces modèles: (Kim, Hong, & Park, 2011)).

3. Récepteur à l'IL-7 et signalisation

Le récepteur membranaire à l'IL-7 (IL-7R) se compose de deux chaînes qui dimérisent après fixation du ligand : CD127 (IL-7R α) et CD132 (γ c). La chaîne CD127 est partagée avec le récepteur à la TSLP (« Thymic Stromal Lymphopoietin ») (Pandey et al., 2000) et la chaîne CD132 est commune aux récepteurs de l'IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 et IL-21 (Rochman, Spolski, & Leonard, 2009). Les principales voies de signalisation mobilisées font intervenir les protéines JAK/STAT (pour « Janus Kinases » et « Signal Transducers and Activators of Transcription ») et PI3K (« Phosphoinositide 3-kinase »), (**Figure 16**). Elles aboutissent respectivement à la régulation de la survie, de la prolifération, du métabolisme et des propriétés migratoires de la cellule (Kerdiles et al., 2009).

Le récepteur à l'IL-7 existe également sous forme soluble et interviendrait dans la régulation fine de la biodisponibilité de son ligand (Lundström et al., 2013).

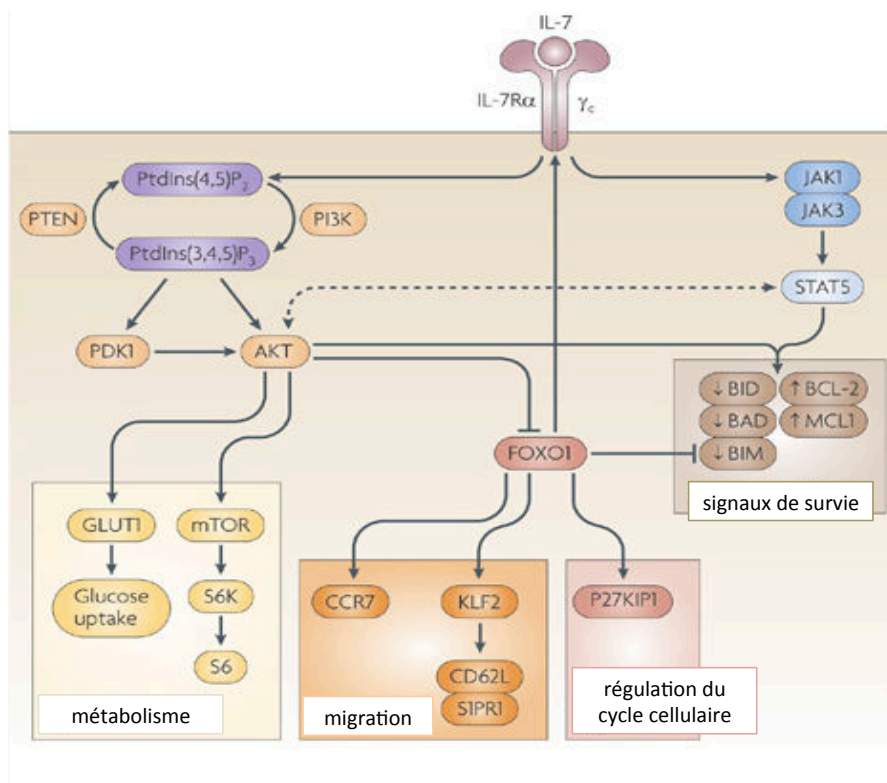


Figure 16 : Principales cascades de signalisation déclenchées par la fixation de l'IL-7 sur son récepteur en surface des lymphocytes T naïfs.
D'après (Mackall, Fry, & Gress, 2011)

4. IL-7 et immunité muqueuse

Le rôle physiologique de l'IL-7 dans l'homéostasie du compartiment T des muqueuses intestinales est encore mal connu. Dans l'intestin grêle, l'IL-7 est produite par les cellules épithéliales et en particulier par les cellules caliciformes ; les entérocytes exprimeraient un récepteur à l'IL-7 fonctionnel, laissant penser qu'une régulation autocrine de la sécrétion d'IL-7 est possible (Reinecker & Podolsky, 1995). L'expression de CD127 a pu être détectée par immunohistochimie et cytométrie de flux à la surface des IEL et des LPL (Watanabe et al., 2004). L'IL-7 humaine recombinante induirait la prolifération des IEL et LPL fraîchement isolés de biopsies jéjunales ou issues du colon de patients sains (Bilenker, Roberts, Brolin, & Ebert, 1995), (Watanabe et al., 2004). L'IL-7 produite par les entérocytes serait indispensable au développement des plaques de Peyer et des IEL non conventionnels (exprimant un TCRγδ). Concernant les IEL, ces données semblent contradictoires avec d'autres travaux démontrant l'origine thymique des IEL γδ par le fait que leur maintien dans la muqueuse serait en fait indépendant de l'IL-7 issue des cellules épithéliales (Shitara et al., 2013).

Chez l'Homme, l'injection d'IL-7 induit une lymphopénie T périphérique transitoire (Sportes et al., 2008). Ce phénomène a pu être attribué, du moins en partie, au homing des cellules T naïves dans la muqueuse intestinale, via l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ et de CXCR4 (Cimbro et al., 2012). Chez le macaque rhésus, l'injection d'IL-7 simienne recombinante à des animaux sains induit l'augmentation de l'expression de CXCR4, CCR6 et CCR9 par les cellules T circulantes qui migrent vers les ganglions lymphatiques, la peau et la muqueuse intestinale pour y proliférer (Beq et al., 2009).

Le rôle de l'IL-7 dans l'immunité muqueuse est plus rarement exploré dans le contexte de l'infection par le VIH/SIV, où le tractus gastro-intestinal est une cible majeure de la réplication virale.

IV. ATTEINTE DE LA MUQUEUSE DIGESTIVE EN PHASE AIGUE D'INFECTION PAR LE SIV

Nous avons évoqué précédemment le tropisme des VIH/SIV pour les lymphocytes T CD4⁺ activés de la muqueuse intestinale, quel que soit le mode de transmission de ces virus. Cette dernière partie se concentre sur les données évoquant l'atteinte du tractus intestinal par le SIV dès la phase aiguë de l'infection. Nous verrons ensuite que la grande majorité de ces travaux sur l'atteinte de la muqueuse digestive a été effectué grâce au modèle du macaque rhésus d'origine indienne, un modèle à la pathogénèse accélérée comparé à la progression de la pathologie associée au VIH-1 chez l'Homme (voir en D). Ces éléments nous permettront finalement de définir le principal objectif de mes travaux de thèse.

A. Déplétion des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux

Dès le début de l'épidémie, des complications du tractus gastro-intestinal ont été mises en évidence chez les personnes infectées par le VIH-1 progressant vers le stade SIDA. Malabsorption des nutriments, diarrhée et perte de poids étaient communément observés chez ces patients (Kotler, Gaetz, Lange, Klein, & Holt, 1984), (Gillin et al., 1985).

1. Déplétion des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux chez les patients en SIDA

La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse intestinale a été mise en évidence dès la fin des années 80 chez des patients en phase chronique tardive d'infection par le VIH-1 et au stade SIDA ((Rodgers, Fassett, & Kagnoff, 1986), (Ullrich et al., 1990), (Schneider et al., 1995)). Cette dernière étude réalisée par Schneider et collègues met en évidence que (i) la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ est plus sévère dans la muqueuse intestinale que dans le sang périphérique, ce qui met en lumière une atteinte privilégiée du tractus gastro-intestinal, et (ii) plus la pathologie est avancée plus la déplétion est sévère. En effet, le duodénum des patients asymptomatiques en phase chronique est moins atteint par la déplétion que celui des patients en SIDA.

2. Apport du modèle macaque rhésus d'origine indienne pour l'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1

L'utilisation du macaque rhésus d'origine indienne infecté par le SIVmac en tant que modèle d'étude de la physiopathologie de l'infection par le VIH-1 a permis le diagnostic d'entéropathies survenant dès la première semaine après l'infection des animaux. Ces résultats laissent penser que le tractus intestinal serait déjà le siège d'une réplication virale intense aboutissant très probablement à ces dysfonctionnements.

a. Infection rapide de la muqueuse intestinale des PNH

En accord avec le tropisme muqueux du SIV/VIH-1 décrit précédemment, les recherches s'accordent sur le fait que le virus se dissémine rapidement dans la muqueuse intestinale. Dans le modèle macaque infecté par voie rectale, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ touche la muqueuse intestinale avant d'affecter les ganglions lymphatiques et le sang périphérique (Couëdel-Courteille et al., 2003). Chez l'Homme, les lymphocytes T CD4⁺ isolés de biopsies intestinales contiendraient plus d'ADN et d'ARN viral que les lymphocytes T CD4⁺ circulants (Mehandru et al., 2007).

Les cellules productivement infectées (contenant de l'ARN viral) sont détectées par hybridation *in situ* au niveau des sites inducteurs du GALT avant d'être visible dans la lamina propria durant la phase aiguë de l'infection chez le macaque rhésus (Couëdel-Courteille et al., 2003). A des stades plus tardifs chez l'Homme, en utilisant la même technique, le VIH-1 est retrouvé dans les sites inducteurs du GALT au niveau des centres germinatifs et de la zone T des follicules mais seulement très rarement dans la lamina propria (Mehandru, 2004).

Cependant, d'autres publications investiguant la dissémination et la réplication virale dans le modèle macaque infecté par le SIVmac montrent une infection rapide aussi bien des sites inducteurs du GALT que des sites effecteurs (Q. Li et al., 2005).

b. Principales références bibliographiques documentant la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux en phase aiguë d'infection par le SIV

Depuis sa mise en évidence à la fin des années 90 par des équipes américaines, nombre de publications documentent une déplétion massive et rapide des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse de l'intestin grêle jusqu'au rectum (**Tableau 2**). Cette déplétion touche majoritairement les lymphocytes T mémoires/activés CD4⁺ CCR5⁺ de la lamina propria (Mehandru, 2004), et concernerait en majorité les lymphocytes de type Th17 (Brenchley et al., 2008).

Si la plupart des études utilisent le même modèle primate du macaque rhésus indien infecté par le SIV_{mac}, notons que la sévérité de la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux varie parfois de façon conséquente. Afin d'y voir plus clair, le tableau 2 rassemble les principales données de la littérature concernant la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ du tractus digestif au cours des quinze premiers jours après infection SIV pathogène et le premier mois post-infection par le VIH-1. Dans ce tableau sont listés : le modèle PNH utilisé, la souche virale et son mode d'inoculation, le segment du tractus digestif analysé, la méthode employée, la population de lymphocytes T visée et le temps post-infection étudié. Quand l'information est présente, les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules déplétées par rapport au contrôle non infecté afin de refléter la sévérité de la déplétion. Les études effectuées sur des biopsies humaines provenant de patients infectés depuis peu par le VIH-1 y sont également référencées (Guadalupe et al., 2003) et (Mehandru, 2004). Cependant, il s'agit bien évidemment de temps moins précoces suivant une transmission du virus dont le moment est estimé d'après les patients et cliniciens. Comme nous l'avons précédemment évoqué, notons aussi que ces patients sont probablement symptomatiques et donc peut-être non représentatifs de l'ensemble de la population.

référence	modèle	virus et inoculation	organe	méthode	lymphocytes analysés	jours post-infection	sévérité de la déplétion
Smit-McBride et al, 1998	MR indien	SIVmac251, I.V. et I.Vag. (pas de distinction)	jéjunum	cytométrie de flux	LPL CD4+ CD8- et DP (CD4+ CD8+)	J7	augmentation de 44% de T CD4+ LPL
					IEL CD4+ CD8- et DP (CD4+ CD8+)	J14	pas de déplétion
						J7	50%
Veazey et al, 1998	MR indien	SIVmac239	jéjunum, iléum, colon	cytométrie de flux	LPL T CD4+ actives (CD25+)	J7	30-50%
				IHC	lymphocytes T CD4+	J14	80%
						temps non indiqué	"data not shown"
Kewenig et al, 1999	MR indien (dédié)	SIVmac251, I.V. et I.R.	duodénum	cytométrie de flux	lymphocytes T CD4+	J7	30-40%
						J14	90%
Veazey et al, 2000	MR indien	SIVmac251, I.V.	jéjunum	cytométrie de flux	lymphocytes T CD4+ CD45RA lo CCR5+	J14	>90%
Guadalupe et al, 2003	patients	VIH-1	jéjunum	cytométrie de flux	lymphocytes T CD4+	1 patient à J30*	27%
						1 patient à J42*	8%
				IHC	cellules CD4+	chronique	non quantifié
Couedel-Courteille et al, 2003	MR chinois	SIVmac251, I.R.	rectum	cytométrie de flux, IHC	LPL T CD4+	J14	30%
			intestin grêle	cytométrie de flux		J14	pas de déplétion
Veazey et al, 2003	MR indien (dédié)	SIVmac251, I.V.	vagin	cytométrie de flux	lymphocytes T CD4+	J14	80%
Brenchley et al, 2004	patients	VIH-1	iléum	cytométrie de flux	lymphocytes T CD4+ CCR5+	J30 *	"nearly complete"
				endoscopie (1 patient)	tissu lymphoïde macroscopique	J30 *	plus de tissu lymphoïde visible
				IHC	cellules CD4+	?	"unable to quantify in small biopsies"
Mehandru et al, 2004	patients	VIH-1	colon	cytométrie de flux	LPL T CD4+	J30 en moyenne*	70%
				IHC	cellules CD4+	J30*	ratio CD4:CD8 de 1,5 à 0,5
Li et al, 2005	MR indiens	SIVmac251, I.Vag.	colon	IHF	lymphocytes T CD4+	J14	50%
Mattapallil et al, 2005	MR indien	SIVmac251, I.V.	jéjunum	cytométrie de flux	lymphocytes T CD4+	J14	80%
Fukazawa et al, 2008	MR chinois, indiens 50/50	SHIV "modérément pathogène", I.R.	jéjunum	IHC	IEL et LPL CD4+	J27	10% des IEL et 20% des LPL

Tableau 2

Tableau 2: Déplétion des lymphocytes T CD4+ du tractus intestinal au cours de la phase aigue après infection par le SIV et tôt après infection par le VIH-1.

MR: macaque rhésus, la sous espèce de macaque rhésus (indien ou chinois) est donnée quand indiquée ou déduite d'après la publication, I.V: intraveineux, I.Vag: intra-vaginale, I.R: intra-rectale, IHC: immunohistochimie, IHF: immunohistofluorescence, LPL: lymphocytes de la lamina propria, IEL: lymphocytes-intra épithéliaux, *: temps post-infection estimé chez les patients après un rapport à haut risque de contamination.

c. Méthodes utilisées pour mesurer la déplétion

Il semble important de considérer que la vaste majorité des études listées se basent sur des analyses en cytométrie de flux, après dissociation enzymatique des tissus ou biopsies. Par conséquent, une diminution du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ pourrait être causée (i) par une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ (Mehandru, 2004) ou (ii) par une diminution vraie du nombre de lymphocytes T CD4⁺.

C'est pourquoi des comptages de lymphocytes T CD4⁺ sont parfois réalisés, ayant lieu sur de nombreux champs de microscopie choisis de manière aléatoire dans la section du tissu analysé (Veazey, 1998), (Mehandru, 2004). Cette dernière étude exprime les résultats obtenus par des comptages manuels en ratio CD4/CD8. Rarement, les résultats sont donnés en nombres de lymphocytes T CD4⁺ par unité de surface (Fukazawa et al., 2008). Chez l'Homme, Brenchley et collègues décrivent l'incapacité de quantifier précisément le nombre de lymphocytes T CD4⁺ de la lamina propria à partir de biopsies au vu de la distribution spatiale très étalée et hétérogène de ces cellules (Brenchley, 2004).

Toutefois, de façon générale, ces comptages après immunomarquage semblent confirmer la chute du nombre des lymphocytes T CD4⁺ au cours des quinze premiers jours suivant l'infection par le SIV chez le macaque rhésus. Le déclin du pourcentage (et parfois du nombre) de lymphocytes T CD4⁺ est observée que le virus soit inoculé par voie sanguine ou directement par voie muqueuse, vaginale ou rectale. Notons tout de même que la sévérité de la déplétion varie considérablement d'une étude à l'autre (**Tableau 2**).

Concernant les mécanismes par lesquels les lymphocytes T CD4⁺ sont déplétés, cette question est encore sujette à débat. Toutefois, elle n'a pas fait partie de mes travaux de recherche. Brièvement, la plupart des résultats cités ci-dessus suggèrent que la déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse intestinale ne serait due qu'en partie à la lyse directe des cellules productivement infectées. Au contraire, la perte de ces cellules serait plutôt multifactorielle et impliquerait notamment la réponse cytotoxique de l'hôte ou bien encore une sensibilité accrue des LPL de la muqueuse intestinale à l'apoptose.

3. Déplétion des lymphocytes T muqueux chez les modèles PNH non pathogènes

De façon plutôt inattendue, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ chez les singes africains a également été mise en évidence chez le mangabey enfumé (« sooty mangabey ») en phase aiguë post-infection expérimentale par le SIVsmm (S. N. Gordon et al., 2007). Dans cette étude, des analyses par cytométrie de flux à partir de biopsies rectales montrent un pourcentage diminué des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoires centrales et mémoires effectrices à J14 post-infection. De plus, la cinétique et la sévérité de la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ chez les sooty mangabeys seraient identiques à ce qui est observé en phase aiguë après infection expérimentale pathogène des macaques rhésus indiens par le SIVmac. Pour aller plus loin, des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés sur ces animaux et révèlent un déclin du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ identique au déclin mesuré dans la muqueuse rectale (S. N. Gordon et al., 2007). Ces travaux suggèrent de façon surprenante que l'infection expérimentale non pathogène par le SIVsmm provoquerait une disparition massive et rapide des lymphocytes T CD4⁺ de l'ensemble des muqueuses.

La même année, ces résultats ont été appuyés par d'autres travaux portant sur les singes verts d'Afrique (*chlorocebus sabaeus*) expérimentalement infectés par le SIVagm (Pandrea et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs mesurent une déplétion très sévère des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux naïfs, mémoires centraux et effecteurs mémoires de l'intestin. Ils estiment que 60 à 95% des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse sont déplétés au cours de la phase aiguë de l'infection par le SIV (toutefois, le segment regardé ne semble pas indiqué).

Ces résultats ont donné naissance à plusieurs hypothèses : (i) les lymphocytes T CD4⁺ déplétés dans la muqueuse intestinale des PNH africains ne seraient pas « les mêmes » que ceux déplétés chez les progressseurs ou (ii) l'évolution des hôtes naturels avec leur SIV a abouti au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale malgré un nombre réduit de lymphocytes T helper.

En conclusion, ces recherches tendent à montrer que l'infection expérimentale non pathogène des PNH d'Afrique induirait une déplétion rapide des lymphocytes T CD4⁺, du moins dans la muqueuse rectale. Cette atteinte serait comparable à la déplétion observée chez le macaque rhésus indien (de 50 à 95% à partir du niveau de base) en phase aiguë d'infection par le SIVmac.

Ces résultats communs aux modèles pathogènes et aux hôtes naturels laissent penser que la déplétion rapide et massive des LPL CD4⁺ de la muqueuse intestinale serait une caractéristique de l'infection aiguë expérimentale par les SIV, et par extension de l'infection par le VIH-1. Ainsi, la déplétion muqueuse des lymphocytes T CD4⁺ *per se* ne peut pas expliquer la survenue de la maladie. Gordon, Pandrea et collègues suggèrent qu'une stabilisation (chez le sooty mangabey) ou même une restauration (chez les singes verts d'Afrique) du niveau de lymphocytes T CD4⁺ muqueux après la déplétion survenant en phase aiguë d'infection seraient une caractéristique de ces modèles naturels non pathogènes.

B. Principales conséquences de la déplétion des LPL CD4⁺ de la muqueuse intestinale chez le macaque rhésus et l'Homme

La dissémination du virus dans le tractus gastro-intestinal des macaques rhésus en phase aiguë d'infection par le SIV aboutit à des perturbations du système immunitaire muqueux. Selon la théorie en vigueur depuis le milieu des années 2000, la déplétion rapide et massive des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux induirait la perte de l'étanchéité de la barrière intestinale (Brenchley et al., 2006). Les principales conséquences de taille pour la progression de la pathologie seraient (i) la translocation des micro-organismes composant le microbiote intestinal à travers l'épithélium jusque la circulation sanguine et (ii) une hyper-activation maintenue du système immunitaire induite, entre autres mécanismes, par cette translocation.

1. Translocation bactérienne

a. Définition

Originellement, la translocation bactérienne a été définie comme étant le passage de bactéries entériques viables de la lumière intestinale à travers l'épithélium de la muqueuse jusqu'à la lamina propria puis aux ganglions mésentériques. Le terme de translocation est généralement utilisé maintenant pour tous les composants microbiens viables et non viables (incluant aussi les produits microbiens comme l'endotoxine) qui passent de manière non physiologique à travers la barrière intestinale. Ce phénomène est associé à nombre de pathologies telles que la maladie de Crohn, l'obstruction intestinale ou bien même encore les pancréatites. En tant normal, les microbes et produits microbiens sont phagocytés dans la lamina propria et les ganglions mésentériques drainants (pour revue : (Wiest, n.d.)).

b. Mise en évidence au cours de la phase asymptomatique chronique

La translocation bactérienne a été mise en évidence en 2006 pour la première fois chez des patients non traités en phase chronique d'infection par le VIH-1 ((Brenchley et al., 2006) et **Figure 16**. Dans cette étude, la translocation de composants bactériens est mesurée par la concentration de lipopolysaccharide (LPS) dans le sérum des individus. En particulier, les patients dont le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants est inférieur à 200 cellules/ml de sang montrent une concentration plasmatique de LPS significativement plus élevée que les individus contrôles non infectés.

Dans la même étude, les mesures du LPS dans le plasma des macaques rhésus infectés depuis 100 jours par le SIVmac ont également révélé une translocation des composants bactériens dans le système sanguin de ces animaux comparés à des singes sains. Récemment, la translocation de composants bactériens a été mise en évidence dans le colon de macaques rhésus indiens (dont la progression vers la pathologie est rapide) au cours de la « phase aiguë tardive » post-infection par le SIVmac (Estes et al., 2010). Au contraire, les patients en primo-infection par le VIH-1 montrent des concentrations sanguines de LPS similaires aux individus sains.

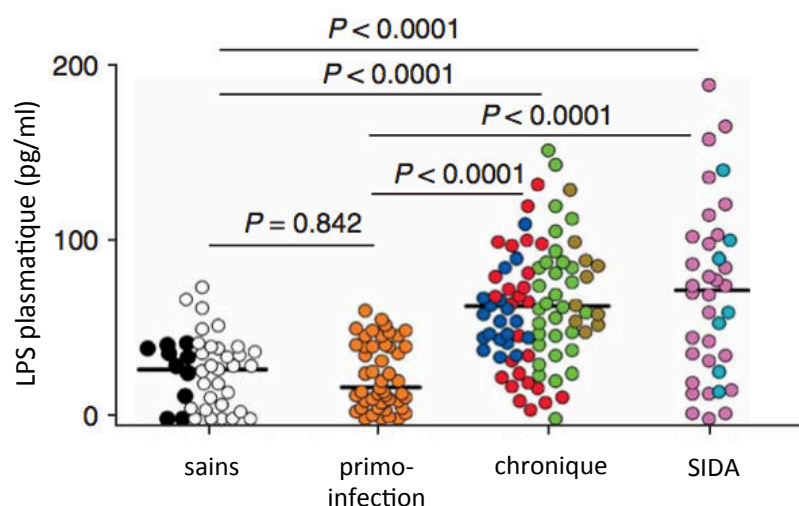


Figure 17 : Mesure de la concentration en LPS plasmatique chez des patients sains et à différents temps post-infection par le VIH-1.

Le LPS plasmatique a été quantifié chez les patients sains, en primo-infection, en phase chronique et au stade SIDA par rapport à des individus contrôles non infectés. Chaque couleur représente une cohorte de patients. D'après (Brenchley et al., 2006).

La translocation bactérienne en phase chronique d'infection par le VIH-1 et le SIV serait une caractéristique des modèles pathogènes. Chez les PNH africains, en effet, la mesure du LPS sérique indique une absence de translocation bactérienne (Estes et al., 2010).

2. Activation du système immunitaire

Nombre de publications suggèrent une association entre la translocation microbienne mesurée chez les individus infectés par le VIH-1 et l'activation du système immunitaire (Marchetti, Tincati, & Silvestri, 2013). La déplétion des LPL (en plus de dommages fonctionnels de l'épithélium intestinal que ne seront pas abordés dans ce manuscrit) abouti à la perte de l'étanchéité de la barrière intestinale. En conséquence, des composants microbiens se retrouveraient dans la lamina propria puis dans circulation sanguine, ce qui abouti à une activation immune (Brenchley et al., 2006).

L'activation immune chronique et maintenue serait une caractéristique des modèles pathogènes (Figure 18). Au contraire, l'absence d'activation chronique du système immunitaire serait la principale particularité des PNH africains, associée à la non pathogénicité de l'infection SIV chez ces hôtes naturels (Chahroudi, Bosinger, Vanderford, Paiardini, & Silvestri, 2012).

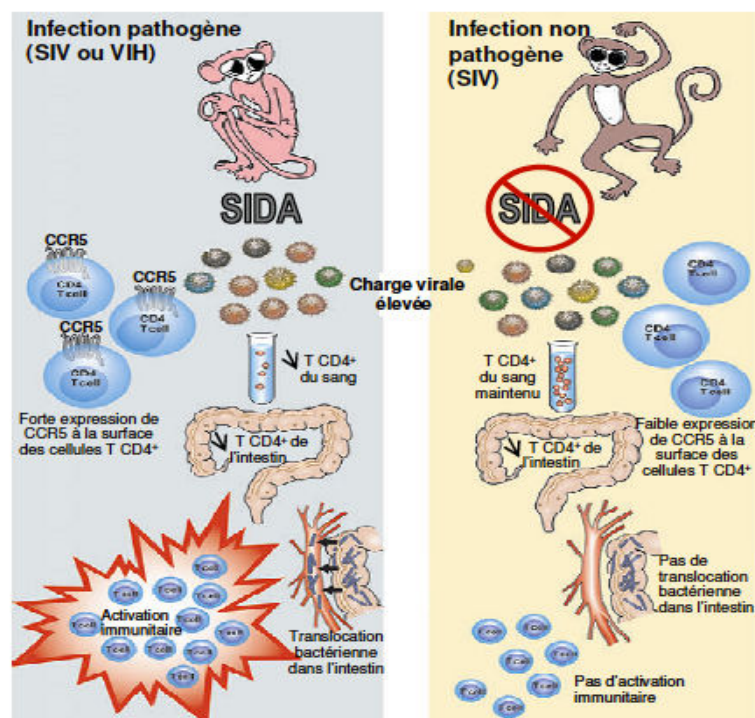


Figure18 : Modèles pathogènes et non pathogènes de l'infection par le SIV.
D'après (Silvestri, 2009)

C. IL-7 et restauration de la muqueuse intestinale

Comme nous l'avons vu précédemment, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux est une caractéristique de la phase chronique avancée de l'infection par le VIH-1. Chez certains patients, malgré les thérapies antirétrovirales, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants et muqueux reste faible. L'administration d'IL-7 à ces patients, en conjonction avec les antirétroviraux, semble améliorer l'intégrité de leur barrière intestinale via une augmentation du pool de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ périphériques et muqueux (biopsies du colon) (Sereti et al., 2014). De plus, l'activation immune serait réduite après traitement. Enfin, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est augmenté dans le sang de ces patients, indiquant une probable augmentation du nombre des lymphocytes T CD4⁺ circulants recrutés vers la muqueuse intestinale.

En conclusion, les modèles PNH ont permis de mettre en évidence qu'au cours de la phase aiguë de l'infection par le SIV, les événements viraux et immunologiques qui se mettent en place sont déterminants pour la progression de la pathologie. Cependant, comme indiqué au début de ce chapitre, la majorité des études effectuées sur la phase aiguë de l'infection l'ont été à partir du modèle macaque rhésus indien qui progresse rapidement vers la pathologie. Le chapitre suivant met en lumière les différences cruciales qui existent entre deux sous-espèces de macaque rhésus, le rhésus indien et le rhésus chinois.

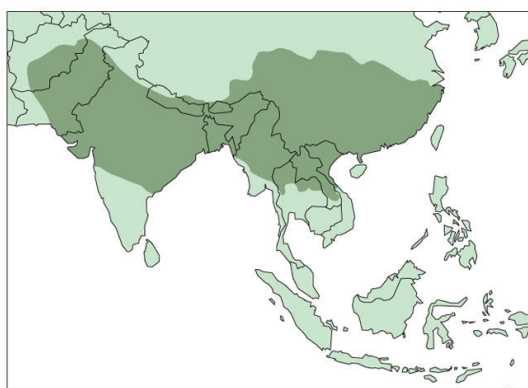
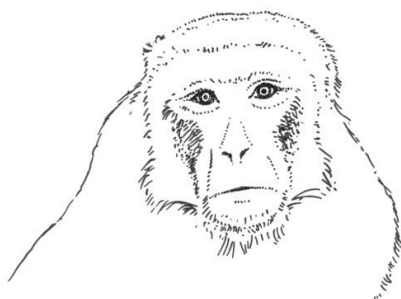
D. Le modèle macaque rhésus d'origine chinoise est un modèle de choix pour l'étude de la primo-infection

1. Deux sous-espèces de macaque rhésus sont utilisées pour la recherche

Parmi les espèces susceptibles à l'infection par le SIV, le macaque rhésus est l'espèce la plus utilisée pour la recherche sur le VIH-1. C'est également l'espèce primate la plus répandue sur le globe après l'Homme, retrouvée de l'ouest de l'Inde jusqu'en Chine (**Figure 19**). En fonction de leur origine géographique, deux principales sous-espèces ont pu être définies par les primatologues qui distinguent les macaques rhésus indiens des animaux d'origine chinoise (D. G. Smith & McDonough, 2005), (Kyes et al., 2006).

Historiquement, le macaque rhésus indien infecté par le SIV a été beaucoup plus étudié que son homologue chinois puisqu'il est le principal modèle fourni par les centres d'élevage aux Etats-Unis. Mais les difficultés éthiques et politiques concernant la capture des animaux en Inde depuis les années 70 ont progressivement abouti (i) à un taux élevé de consanguinité au sein des animaux élevés en captivité et (ii) à la raréfaction de ces animaux pour la recherche (S. Chen et al., 2011). Ces événements ont attiré l'attention sur l'utilisation du macaque rhésus d'origine chinoise comme modèle de la physiopathologie de l'infection par le VIH-1.

a Rhesus macaque
(*Macaca mulatta*)



91

2. Limitations de l'utilisation du macaque rhésus d'origine indienne pour l'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1

a. Une pathogenèse précipitée

La première limitation quant à l'utilisation du macaque rhésus indien concerne la cinétique de progression de la pathologie. En effet ces animaux, infectés par quasiment (sinon toutes) les souches de SIV, progressent de façon beaucoup plus agressive vers le stade SIDA (Trichel, Rajakumar, & Murphey-Corb, 2002). Celui-ci est atteint en seulement moins d'un an contre dix chez l'Homme. Certes, cette progression accélérée rend plus aisée l'étude des événements viraux et immunologiques qui surviennent pendant les trois phases caractéristiques de l'infection. Mais cette cinétique est très éloignée de celle qui est observée chez les patients infectés.

b. Des charges virales très élevées

Après infection des deux sous-espèces de macaque rhésus par le même stock de SIVmac251, le pic de charge virale caractéristique de la réplication du virus atteint de plus hautes valeurs dans le sang des macaques rhésus indiens. En effet, la charge virale est située entre 10^7 et un peu plus de 10^8 copies d'ARN/ml de sang chez ces derniers alors que le pic de virémie plasmatique chez les singes d'origine chinoise oscille entre 10^6 et 10^7 copies d'ARN viral/ml (Ling, Veazey, Luckay, et al., 2002a). Ces éléments suggèrent que la réplication du virus et donc probablement sa dissémination serait plus efficace chez les singes indiens.

De même, plus tardivement, la stabilisation de la charge virale après ce pic de réplication, le « set-point » viral, est nettement plus haute chez le macaque rhésus d'origine indienne puisqu'elle varie de 10^5 jusqu'à 10^8 copies d'ARN viral par ml de sang selon les animaux contre 10^3 à 10^7 chez l'Homme (Marthas, Lu, Penedo, Hendrickx, & Miller, 2001), (Cumont et al., 2008) et **Figure 20**. Il faut souligner ici que la charge virale au set-point est un marqueur pronostic de l'évolution de la maladie : plus haut est le set point et plus l'évolution vers le SIDA est rapide. Au cours de la phase chronique, la charge virale reste plus élevée chez les singes d'origine indienne qui meurent très rapidement.

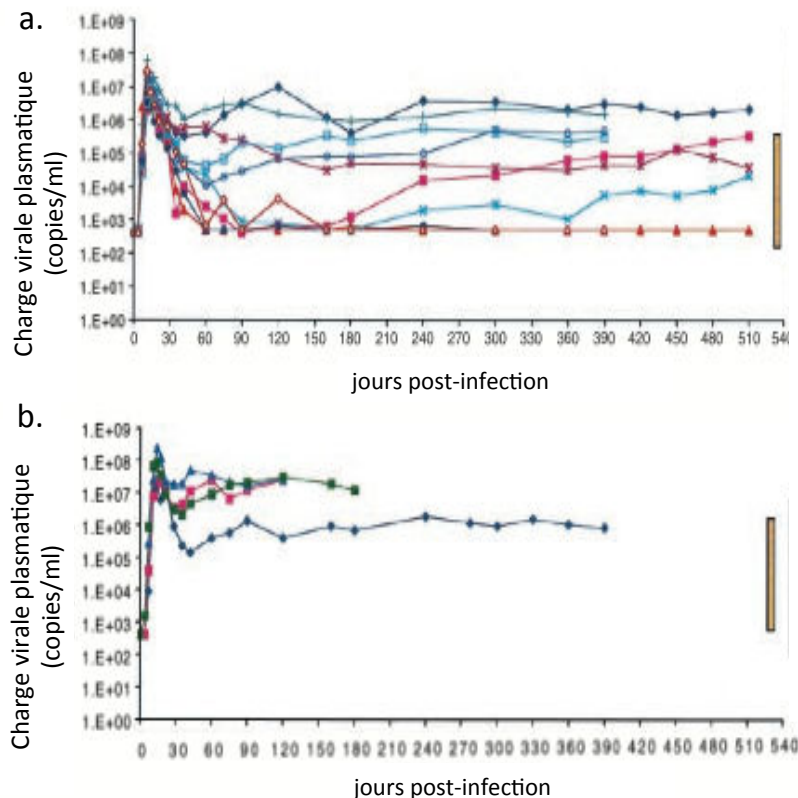


Figure 20 : Comparaison de la charge virale SIV et VIH-1 plasmatique.

La charge virale au pic de virémie suivant l'infection chez le macaque rhésus d'origine chinoise (a.) et indienne (b.) et au set-point viral est comparée avec les données obtenues le plus tôt possible pour 273 patients infectés par le VIH-1 (barres oranges). Les barres oranges représentent l'amplitude de variation du set-point viral chez ces patients. D'après (Ling, Veazey, Penedo, et al., 2002b).

c. Une déplétion rapide et soutenue des lymphocytes T CD4⁺ circulants

Le déclin des lymphocytes T CD4⁺ circulants les jours suivant l'infection serait peut-être corrélé avec l'intensité du pic de charge virale (Davenport et al., 2006). En cohérence avec cette hypothèse, il a été montré que le ratio CD4/CD8 chez le macaque rhésus d'origine indienne chute drastiquement le premier mois post-infection et continue à diminuer jusqu'au décès des animaux. En revanche, le ratio CD4/CD8 chute de façon transitoire chez leurs homologues chinois et remonte un mois après l'infection par le virus, mais sans toutefois atteindre à nouveau la valeur pré-infection (Ling, Veazey, Luckay, et al., 2002a). De plus, une autre étude constate un profond et prompt déclin du pourcentage de lymphocytes T activés CD4⁺ DR⁺ chez les primates indiens alors qu'il n'est que transitoire chez les singes chinois (Cumont et al., 2008).

Là encore, il convient de noter que deux scénarios différents (i) une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ ou (ii) une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺, se traduiraient par la chute du ration CD4/CD8 ou du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺. A ce propos, une étude réalisée par Monceaux et al. montre que le nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ durant la phase aiguë de l'infection par le SIVmac diminue de façon rapide et soutenue dans le sang circulant des primates d'origine indienne, alors qu'il est caractérisé chez l'Homme par une augmentation transitoire (Monceaux et al., 2007).

d. Un déficit de la réponse humorale

Il est bien documenté qu'après infection SIV, une proportion substantielle des macaques rhésus indiens montent une réponse anticorps spécifique très faible, voire inexistante. Cette caractéristique est associée une virémie plasmatique élevée et une progression plus rapide de la pathologie associée à l'infection (Lewis et al., 1994), (Hirsch et al., 1996), (Sodora et al., 1998b), (S. M. Smith et al., 1999).

3. La pathogenèse induite par SIVmac chez le macaque rhésus d'origine chinoise est plus proche de celle des patients infectés par le HIV-1.

Peu d'études ont comparé le développement de la pathologie chez les macaques rhésus d'origine chinoise par rapport aux données connues chez l'Homme (revues par (Y. Zhou, Bao, Haigwood, Persidsky, & Ho, 2013)). Non seulement leur progression vers le stade SIDA se rapproche du temps de survie des patients infectés par le VIH-1 mais les paramètres viraux et immunologiques mesurés chez ces animaux sont également similaires à ceux obtenus dans les cohortes de patients. Issus de plusieurs études, ces différents paramètres sont résumés dans le **Tableau 3**

	MR indien	MR chinois	Patients
Développement du SIDA en:	1 an	6 à 10 ans	10 ans en moyenne
Pic de virémie en phase aiguë (copies d'ARN viral /ml de sang)	$10^7 - 10^8$	$10^6 - 10^7$	Estimé à $10^6 - 10^7$
Charge virale au set-point	$10^5 - 10^9$	$10^3 - 10^6$	$10^3 - 10^6$
Déplétion des lymphocytes T CD4 ⁺ circulants	Sévère Soutenue	Moins sévère et transitoire	Transitoire
Déplétion des LPL en phase aiguë (lymphocytes T CD4 ⁺ CCR5 ⁺)	J7 – J10 post- infection	?	1 étude à 1 mois post- infection estimé, mise en évidence en phase chronique tardive

Tableau 3 : Paramètres viraux et immunologiques recueillis chez les deux sous-espèces de macaques rhésus et les patients infectés par le VIH-1
MR : macaque rhésus

Nous avons vu que les événements immunologiques et virologiques qui surviennent après l'infection par le virus sont critiques pour l'évolution future de la pathologie. De plus, le macaque rhésus chinois infecté par le SIVmac est un modèle plus pertinent pour l'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH. Par ailleurs, il serait aussi un modèle plus indiqué dans des essais d'éradication du virus, puisque la physiopathologie de l'infection autorise la persistance des réservoirs viraux à plus long terme que les singes indiens (Ling et al., 2013). Les mécanismes à l'origine des différences de pathogenèse chez les macaques rhésus ne sont pas encore élucidés. Certaines hypothèses ont vu le jour avec l'intérêt grandissant des chercheurs pour l'utilisation du modèle chinois.

4. Mécanismes limitant la pathogénicité du SIV chez le macaque rhésus chinois

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences de pathogenèse entre les deux sous-espèces de macaque rhésus :

- L'isolat SIVmac251 pourrait être moins adapté aux animaux chinois. En effet cet isolat provient d'un animal d'origine indienne (Daniel et al., 1985) et serait plus adapté à se répliquer au sein de ces animaux. Cependant, Cumont et al. utilisent une souche virale de SIVmac251 précédemment cultivée sur des PBMC dérivés de macaque rhésus chinois mais observent toujours une avancée plus rapide de la maladie chez les animaux indiens infectés par ce virus (Cumont et al., 2008).

- Les macaques chinois semblent montrer des réponses humorales spécifiques plus puissantes, supprimant peut-être le virus de façon plus efficace. Cependant, une grande variation de cette réponse est observée chez ces animaux. La réponse cellulaire cytotoxique spécifique semble également plus efficace chez les singes chinois comparée à celle de leurs homologues indiens (Ling, Veazey, Penedo, et al., 2002b), (Ling, Veazey, Luckay, et al., 2002a). Des études plus poussées sur la réponse cellulaire cytotoxique et humorale sont requises afin de mieux comprendre l'impact de ces réponses sur la pathogénie associée à l'infection SIV. De plus, des différences d'activation du système immunitaire sont à considérer également puisque l'activation immune est maintenant largement incriminée dans la progression de la pathologie (Manches & Bhardwaj, 2009).

- La progression plus lente chez les animaux chinois pourrait être liée à l'existence de facteurs de restriction cellulaires. Cette dernière théorie sous-tend l'existence de différences en termes de facteurs de restriction entre les deux sous-espèces primates. Dans ce sens, une récente étude montre des variations dans le nombre de copies du gène CCL3L, codant un ligand du corécepteur CCR5. D'après cette étude, les animaux d'origine chinoise possèdent beaucoup plus de nombre de copies de CCL3L, suggérant un blocage plus efficace de l'entrée du virus à l'origine de l'avancée plus lente de la pathologie. Notons qu'il est très probable que plusieurs facteurs restants à identifier entrent aussi en compte dans l'avancée de la pathologie associée au SIV.

- Des facteurs génétiques doivent être considérés étant donné la divergence génétique entre ces deux sous-espèces. De potentielles variations du CMH pourraient notamment expliquer ces différences de physiopathologie (M. C. T. Penedo et al., 2005), (Otting et al., 2007). Notons ici que le fond génétique des singes chinois est beaucoup plus représentatif de la diversité génétique humaine.

PRINCIPAUX OBJECTIFS DE RECHERCHE

Historiquement, la recherche sur les VIH s'est concentrée sur les stades tardifs de la pathologie chez les patients infectés. L'utilisation des modèles simiens infectés par le SIV a permis de mettre en lumière l'importance de la phase aiguë de l'infection, au cours de laquelle les événements virologiques et immunologiques qui se mettent en place sont déterminants pour la progression de la pathologie (Lifson et al., 1997), (S. M. Smith et al., 1999). Mon travail de thèse s'articule autour de l'objectif fondamental d'avancer dans la connaissance de la phase aiguë qui suit la contamination par le VIH-1.

L'étude des premiers jours suivant l'inoculation du SIV a aussi révélé le rôle central du tractus intestinal dans la pathogenèse associée à l'infection. Le tractus intestinal est l'interface la plus étendue entre l'organisme et l'environnement extérieur (Helander & Fändriks, 2014). Particulièrement abondants dans la lamina propria, les lymphocytes T CD4⁺ activés représentent une cible privilégiée pour la réplication virale (Veazey et al., 1997). Dans le modèle du macaque rhésus indien infecté par le SIVmac, il est aujourd'hui établi qu'une déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺ de la lamina propria survient dès les premiers jours après l'infection (Veazey, 1998), (Mattapallil et al., 2005). Cette perturbation de l'immunité muqueuse autoriserait la mise en place d'une activation non résolue du système immunitaire via notamment la translocation de micro-organismes en provenance de la lumière intestinale (Brenchley et al., 2006).

Le macaque rhésus indien infecté par le SIVmac est le modèle d'étude le plus largement répandu pour la recherche sur le VIH-1. Toutefois, ces animaux infectés présentent une pathogenèse agressive comparée à la progression de la pathologie humaine. Une autre sous-espèce de macaque rhésus définie notamment d'après son origine géographique chinoise et possédant un fond génétique différent a fait l'objet d'un intérêt croissant pour la recherche sur le VIH. Le macaque rhésus chinois infecté par le SIVmac est désormais reconnu comme modèle plus fidèle pour l'étude de la phase aiguë de l'infection (Trichel et al., 2002), (Y. Zhou et al., 2013). En effet, la survie de ces animaux et les paramètres viraux reflètent mieux ceux des patients infectés (Ling, Veazey, Penedo, et al., 2002b). Étonnamment, l'atteinte précoce de la muqueuse intestinale n'est que rarement documentée dans ce modèle. J'ai débuté mon projet de thèse avec une autre visée fondamentale : générer des connaissances concernant le modèle expérimental du macaque rhésus chinois infecté par le SIV, modèle qui promet d'être de plus en plus utilisé pour la recherche sur le VIH.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse pourrait être moins agressive chez le macaque rhésus chinois et serait associée à la plus lente progression de la pathologie, comparable à celle des individus infectés. Ainsi, **mon premier objectif a été de déterminer la cinétique et l'importance de la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse intestinale chez le macaque rhésus d'origine chinoise en phase aiguë d'infection par le SIVmac.**

D'importantes fluctuations du nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ ont été décelées dans le sang des animaux au cours de l'infection aiguë par le SIV. Par la suite, j'ai donc cherché à **évaluer l'impact de l'infection du compartiment intestinal sur la perturbation du pool de lymphocytes T périphériques.** L'un des processus contribuant directement aux variations du pool de lymphocytes T en périphérie implique leur migration dans les tissus lymphatiques. Pourtant, le trafic des lymphocytes T vers la muqueuse intestinale les premiers jours après infection par le SIV n'est que rarement documenté.

MATERIEL & METHODES

I. Animaux, infections et échantillonnage

A. Animaux et infections

Le modèle animal utilisé pour cette étude est le macaque rhésus chinois (*macaca mulatta*). Les animaux ont été hébergés au Centre de primatologie de l'Institut Pasteur de Paris conformément aux directives éthiques du Parlement Européen. Toutes les expérimentations ont été réalisées sous anesthésie générale au Zolétil (tiletamine/zolasepam ; 4,6mg/kg). Trois prélèvements sanguins de 7mL sur acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) ont été effectués à 10 et 7 jours pré-infection ainsi que le jour de l'infection.

Les infections ont été réalisées par voie intra-veineuse avec 50AID₅₀ (*Animal Infectious Dose 50*) de la souche pathogène SIVmac₂₅₁ (stock viral fourni par le Pr. Anne-Marie Aubertin, Strasbourg, France). Des prélèvements sanguins de 7mL sur EDTA ont été effectués à 3, 5, 7, 10, 12 et 14 jours post-infection. Les animaux sacrifiés ont été euthanasiés avec une dose létale de pentobarbital (Doléthol ; 1mL/kg). Préalablement à chaque euthanasie, 150mL de sang est prélevé sur EDTA.

Mes travaux ont inclus 20 animaux parmi lesquels 9 singes ont été infectés puis sacrifiés à différents temps au cours de l'infection aiguë : à J3 (n=3), J7 (n=2), J10 (n=2), J14 (n=2) pi. Deux animaux ont été sacrifiés à J65 pi et un animal a été euthanasié à un an pi. Trois animaux témoins non infectés ont également été euthanasiés.

Les animaux infectés non sacrifiés ont été suivis longitudinalement par prélèvements sanguins.

A réception des prélèvements sanguins, 4 ampoules (ou 10 lors d'une euthanasie) de 500µL de sang total sont immédiatement congelées en sérum de veau fœtal (SVF) supplémenté de 10% en diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservées en azote liquide jusqu'à utilisation. Un aliquot de 100µL de sang est également prélevé afin de réaliser une numération formule sanguine (NFS) sur un Vet'ABC (Scil animal care company, France).

Le sang restant est ensuite centrifugé 10 minutes à 1000G et le plasma est réparti en ampoules de 1mL et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Le culot cellulaire est repris dans 10mL de tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate buffered Saline*) et les cellules mononucléées du sang (PBMC, *Peripheral Blood mononuclear Cells*) sont séparées en gradient de densité de Ficoll (Eurobio). Deux culots secs de $1,5 \cdot 10^6$ cellules sont réalisés par centrifugation de 5 minutes à 10 000G et élimination du surnageant. Ils sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Le reste des PBMC est cryopréservé en SVF supplémenté de 10% DMSO dans de l'azote liquide.

B. Echantillonnage

Le jour de l'autopsie, les organes lymphoïdes (ganglions axillaires, inguinaux et mésentériques, thymus, rate) et non lymphoïdes (peau, poumons) ainsi que les différents segments de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléum, colon ascendant, colon descendant et rectum) sont prélevés et conservés en PBS froid jusqu'à leur dissection.

Un échantillonnage de dix morceaux de 2mm² environ est réalisé pour chaque organe. Les morceaux sont immédiatement conservés à sec à -80°C pour les extractions d'ARN et ADN. En parallèle, pour de futures études histologiques, de plus gros morceaux de tissus sont : (i) soit inclus dans un cryoprotecteur (OCT compound, Labonord) pour être congelés dans de l'isopentane refroidi en azote liquide et conservés à -80°C, (ii) soit fixés en formol 4% pendant 24 heures pour être ensuite inclus en paraffine.

Les ganglions, la rate et le thymus sont également dilacérés sur des filtres en nylon stérile de 70µm (Cell strainer, BD Falcon) afin de récupérer les cellules qui sont ensuite congelées en SVF supplémenté de 10% DMSO et conservées dans de l'azote liquide.

II. Quantification de l'expression des chimiokines et de l'IL-7

A. Extraction des ARN totaux à partir des morceaux d'organes

Les morceaux d'organes congelés secs lors de l'autopsie des animaux sont lysés par 2 cycles successifs de 2 minutes à 30 Hertz au Tissue Lyser II (Qiagen) avec une bille en acier dans 600 µl de tampon RLT qui permet également l'inactivation des RNases (Qiagen). Puis les lysats sont homogénéisés avec les colonnes QIAshredder (Qiagen, élimine les gros débris qui pourraient saturer les colonnes) par centrifugation 2 minutes à 16 000 G.

Les ARN messagers (ARNm) sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon le protocole fourni par le fabricant. Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique, une incubation sur colonne avec 30 unités de DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen) est réalisée 15 minutes à température ambiante au cours de l'extraction des ARN. Les ARN sont élués dans le volume d'eau distillée optimisé en vue des quantifications (2 fois 50µl pour les morceaux et 2 fois 40µl pour les culots de cellules).

B. Reverse transcription

Dix microlitres d'ARN sont transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit QuantiTect Rev Transcription (Qiagen) selon les indications du fournisseur. Les ADNc sont dilués en vue de permettre la réalisation de plusieurs quantifications sur un même échantillon (ajout de 20µl d'eau distillée aux cDNA extraits des cellules contre 40µl pour les morceaux).

C. PCR nichée

1. Pré-amplification par PCR

Une pré-PCR est réalisée en triplicata sur 5µL d'ADNc avec les amorces externes correspondant à la séquence de l'IL-7 ou de chaque chimiokine étudiée (**Tableau 4**, amorces « Out ») concentrées à 100pM ; 3,5mM de MgCl₂ ; 200µM de dNTP et 2,5 unités de *Taq* polymérase en tampon 1X (Roche, tous les réactifs) dans un volume final de 50µl selon les étapes suivantes :

- dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C
- 25 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C, 3 minutes à 72°C.

Pour chaque échantillon, les ADNc codant pour les chimiokines CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL28, CXCL8, CXCL10 et CXCL12 sont co-amplifiés chacun avec l'ADNc du gène de ménage HPRT (Hypoxanthine PhosphoRibosylTransférase). Les ADNc codant pour l'IL-7 sont également co-amplifiés avec l'ADNc codant pour HPRT.

Les ADNc codant les chimiokines CCL5, CCL20, CCL28 et CXCL10 sont co-amplifiées en multiplex avec le gène de ménage HPRT après vérification de l'efficacité de la PCR. Il en est de même pour les chimiokines CCL3, CCL11, CCL25 et CXCL8.

Un témoin positif constitué d'un plasmide contenant une copie de l'ADNc de HPRT et de l'ADNc de chaque chimiokine est également amplifié.

2. Quantification en temps réel

La quantification est réalisée par PCR en temps réel au LightCycler480® grâce à la technologie SYBR Green (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche Applied Science). La PCR en temps réel est réalisée à partir de 5 µl de chaque produit de pré-PCR préalablement dilués 100 fois. La réaction de quantification s'effectue en présence de 20 pmol d'amorces internes spécifiques de l'ADNc de HPRT ou consensus des ADNc codant chaque chimiokine (**Tableau 4**, amorces « In »), additionné d'une unité de Taq polymérase dans un volume final de 14 µl selon les étapes suivantes :

- une dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C
- 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 6 secondes à 64°C, 5 secondes à 72°C (avec une lecture de la fluorescence à la fin de la phase d'élongation).

Une gamme standard est effectuée lors de la quantification des échantillons par la dilution successive (10^{-1} à 10^{-7}) des plasmides témoins. Les données obtenues sont analysées sur le logiciel LightCycler480® Software version 1.5.

Cette technique nous permet donc de contrôler à chaque amplification que l'efficacité des PCR « OUT » et « IN » est identique pour nos gènes cibles comme pour le gène de ménage HPRT et nous permet, après normalisation, d'obtenir des ratio « quantité d'ARNm codant pour la protéine cible / quantité d'ARNm codant pour la protéine HPRT ».

Amorce	Séquence sens	Séquence anti-sens
HPRT out	CTGAACGTCTTGCTCGAGAT	CGACCTTGACCATCTTTGGA
HPRT in	CACATTGTAGCCCTCTGTGT	CTGACCAAGGAAAGCAAAGT
CCL2 out	AACATCCAGTGCTCAAAGTAA	TCCAGGTGGTCCATGGAAT
CCL2 in	CTGCTCATAGCAGCCACCTTCA	TCCTGAACCCACTTCTGCTT
CCL3 out	CATTCATCACCTGCTCAGAA	TCCAGGTGCTGACGTATTT
CCL3 in	CAACCGGATCTCAGCAACAT	GCCGGCCTCTCTTGTTA
CCL4 out	CCATGAAGCTGCGCGTGA	CTCAGTTCAGTTCCAGGTCA
CCL4 in	CCCACCTCCTGCTGCTT	GCAGACTTGCTTCCCTCTTTT
CCL5 out	GCTGTCATCCTCGTTGCTA	CTCATCTCCAAAGAGTTGATGTA
CCL5 in	ACATGCCTCAGACACCACA	TACTCCCGAACCATTCTT
CCL11 out	TGAAGGTCTCCACAACACT	TGGCTTTGGAGTTGGAGAT
CCL11 in	TGCAACCACCTGCTGCTTTA	TTGGAGATTTTCGGTCCAGATA
CCL19 out	ACCGTTGGCCTGCCTCTGTT	CTGCTGCGGCGCTTCATCTT
CCL19 in	CAGCCTGCTGGTTCTCTGGA	TCCTCTGCAGTCTCTGGAT
CCL20 out	CCATGTGCTGTACCAAGAGT	TGCTGAGGCGACGTACAATA
CCL20 in	TTGCTCCTGGCTGCTTTGA	CCCAGGTCTGCTTTGGATT
CCL21 out	CCTCAGCTCTGGCCTCTTA	TCACTGGGCTATGGCCCTTTA
CCL21 in	ATGGCTCAGTCACTGGCTCT	CTATGGCCCTTTAGGGGTCT
CCL25 out	CACACCCAAGGTGTCTTTGA	TTAGCTGATGTCAGGAGGGA
CCL25 in	TTATCGGATCCAGGAGGTGA	CTGCTGGTGGGATTGCTAAA
CCL28 out	AAGGCTCCTGGAAAGAGTGAA	GTTTCGTGTTTCCCCTGATGT
CCL28 in	TCGCATCCAGAGAGCTGAT	CTGATGTGCCCTGTTACTGT
CXCL10 out	TGATTTGCTGCCTTGTCTTTCT	ACCTCTTCTCACCTTCTTTT
CXCL10 in	CTCTCTCAAGAACTGTACGCT	CATGTGGACAAAATTGACTTGGA
CXCL12 out	GTCAGCCTGAGCTACAGAT	TTTCTCCAGGTACTCCTGAA
CXCL12 in	TACAGATGCCCATGCCGATT	TCGGGTCAATGCACACTTGT
IL-7 out	TTTGGACTTCCTCCCCTGAT	GTGTTCTTTAGTGCCCATCAAAAT
IL-7 in	CCCCTGATCCTTGTTCTGTT	GCGAGCAGCACGGAATAAAA

Tableau 4 : Séquences des amorces externes (« out ») et internes (« in ») utilisées pour la quantification des ARNm codant les chimiokines et l'IL-7 par PCR nichée

III. Quantification de la réplication virale dans le plasma et le tractus digestif

A. Quantification de la charge virale plasmatique

La charge virale SIV a été déterminée à partir des prélèvements sanguins par le service de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS, Nathalie Dereuddre-Bosquet, service d'Immunovirologie, DSV/iMETI/SIV/TIPIV, CEA Fontenay-Aux-Roses, France).

B. Quantification de l'ADN viral dans les tissus

L'ADN total est isolé à partir des morceaux d'organes congelés lors de l'autopsie. Les tissus sont lysés mécaniquement à l'aide d'une bille d'acier de la même façon que pour l'extraction d'ARN. Une fois les tissus désolidarisés, 150 μ L de protéinase K (PK) à 200 μ g/ml sont ajoutés et les cellules sont lysées par 30 minutes d'incubation à 56°C. La PK est inactivée 10 minutes à 98°C.

Les gènes CD3 (chaîne γ) et gag sont amplifiés simultanément par une pré-PCR sur 5 μ l de lysat dilué au 10^{ème} en présence de 100pmol d'amorces externes spécifiques du gène CD3 γ et du gène viral gag (**Tableau 5**) avec 3,5mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP et 1,25 unités de Taq polymérase en tampon 1X dans un volume final de 50 μ l selon le protocole suivant : une dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C puis 25 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 3 minutes à 72°C. Un témoin positif (servant de courbe standard pour la quantification) est également amplifié sur un plasmide contenant une copie de l'amplicon CD3g et une copie de l'amplicon *gag*.

Comme dans le paragraphe II.C.2, les gènes de CD3 γ et gag sont quantifiés séparément avec la technologie SYBR Green. La PCR en temps réel est réalisée sur 1/200^{ème} des produits de pré-PCR en présence de 20pmol d'amorces internes spécifiques du gène CD3 γ ou spécifiques du gène gag (**Tableau 5**) et additionné d'une unité de Taq polymérase dans un volume final de 14 μ l selon les étapes suivantes :

- une dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C
- 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 15 secondes à 55°C, 10 secondes à 72°C (avec une lecture de la fluorescence à la fin de la phase d'élongation).

Une gamme standard est effectuée lors de la quantification des échantillons par la dilution successive (10⁻¹ à 10⁻⁷) du plasmide témoin.

Les données obtenues sont analysées sur le logiciel LightCycler480® Software version 1.5 (Roche Diagnostics). Afin de mesurer la concentration en ADN viral pour 10⁵ cellules et sachant que, par définition, chaque cellule contient deux copies du gène CD3, la formule suivante est appliquée :

$$\text{ADN viral pour } 10^5 \text{ cellules} = \frac{\text{nombre de copies de gag} \times 10^5}{\text{nombre de copies de CD3}} \times 2$$

C. Quantification de l'ARN viral SIV dans les tissus

L'ARN viral a été quantifiée dans les organes par RT-qPCR nichée comme décrit précédemment (voir partie II). Les amorces utilisées sont listées dans le **Tableau 5**

Amorce	Séquence sens	Séquence anti-sens
ARN et ADN		
GAG-SIV out	CAACAAGGACAGCTTAGGGA	TTGACAGGCCGTCAGCATTT
GAG-SIV in	CCGTCAGGATCAGATATTGCA	TTCACACCCAGCCCCTTCAGC
ADN		
CD3 out	ACTGACATGGAACAGGGGAA	AGCTCTGAAGTAGGGAACATAT
CD3 in	GGCTATCATTCTTCTCAAGGTA	TTCCTGGCCTATGCCCTTTT

Tableau 5 : amorces utilisées pour la quantification de l'ADN et l'ARN viral

IV. Hybridation in situ couplée à l'immunomarquage

A. Synthèse des sondes spécifiques des ARNm CCL19 et CCL25 de macaque rhésus

Au laboratoire, des plasmides pCR™ II-TOPO® (invitrogen) contenant soit un insert de 321 bases pour le gène CCL19 cloné en EcoRI soit un insert de 374 bases pour le gène CCL25 également cloné en EcoRI sont disponibles. Dans ces plasmides, en 5' du gène cloné on trouve le promoteur SP6 et en 3' le promoteur T7. Après linéarisation des plasmides par digestion enzymatique avec soit l'enzyme de restriction XbaI (New England Biolabs), pour pouvoir synthétiser les sondes à partir du promoteur Sp6, soit l'enzyme de restriction SpeI (New England Biolabs), pour pouvoir synthétiser les sondes à partir du promoteur T7, on purifie ces ADN linéarisés en utilisant le QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. L'obtention de ces ADN linéarisés permet la génération des sondes marquées à la digoxygénine (DIG) en réalisant une transcription *in vitro* avec le DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche Applied Science) selon les recommandations du fabricant.

Ces sondes sont purifiées à l'aide du RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN), selon les recommandations du fabricant. Après vérification de la taille de la sonde par retard sur gel d'agarose dénaturant (1,2% d'agarose + 1% formaldéhyde) et détermination de l'efficacité de la réaction de transcription et de couplage à la DIG par immunodétection de la DIG avec un anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase (Roche Applied Science) sur membranes de nylon chargées positivement (Roche Applied Science), selon les recommandations du fabricant.

Les sondes sont diluées à 10ng/ μ L directement dans le tampon d'hybridation (40% Formamide, 10% Dextran sulfate, 10mM DTT, 1mg/mL d'ARNt de levure, SSC 4X, Denhardt's Solution 1X, dans de l'eau DEPC) qui sera utilisé pour faire l'Hybridation *in situ* et on conserve celles-ci à -80°C.

Les sondes antisens s'hybrideront avec les ARNm de CCL19 ou CCL25 présents dans les tissus, alors que les sondes sens qui correspondent à des séquences antiparallèles des séquences antisens complémentaire des ARNm cibles ne pourront pas s'hybrider. Les sondes sens permettent donc d'avoir un contrôle négatif. Si l'hybridation avec la sonde sens donne un signal, on conclura alors à la formation d'hybrides non spécifiques pour une partie des hybrides formés entre la sonde antisens et les ARNm cibles.

B. Hybridation in situ couplé à l'immunomarquage

1. Hybridation in situ

Les morceaux sont inclus et congelés en OCT sont coupés à -20°C avec une épaisseur de 12 μ m sur des lames SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser) à l'aide d'un cryotome et sont ensuite fixées 20 minutes dans du formol froid 4% tamponné (Labonord). Les lames sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes en PBS1X traité avec 0.1% de diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma Aldrich) puis acétylées deux fois 5 minutes (afin d'enlever les radicaux libres pouvant se fixer à l'ARN) dans une solution de triéthanolamine 0,1 M, pH 8,0 (Sigma Aldrich) contenant 0,25% d'acide acétique anhydre (Sigma Aldrich) ajouté extemporanément. Les lames sont ensuite rincées 2 fois 5 minutes en PBS1X/DEPC.

L'étape de pré-hybridation est réalisée dans un four à hybridation et les lames sont placées dans une chambre humide. Les coupes sont incubées 1 heure à 58°C avec du tampon d'hybridation (préalablement décrit) auquel est ajouté 1mg/mL d'ADN de sperme de saumon (invitrogen) préalablement soniqué durant 45 secondes et dénaturé (chauffé 2 heures à 95°C puis placé immédiatement dans la glace).

L'étape d'hybridation est également réalisée dans un four à hybridation et les lames sont placées dans une chambre humide. Le tampon d'hybridation additionné de 1mg/mL d'ADN de sperme de saumon et d'une des 4 sondes à une concentration de 2ng/ μ L est préalablement dénaturé 5 minutes à 80°C, placé 1 minute dans la glace, avant d'être déposé sur les coupes.

Environ 30 μ L de tampon d'hybridation + sonde sont déposés par coupe, puis chaque coupe est recouverte d'une lamelle scellée avec du Rubber Cement (Sanford) et est incubée trois jours à 58°C.

A la fin de l'étape d'hybridation, les lamelles sont retirées et les coupes subissent des lavages de stringence croissante, un premier lavage de 15 minutes en SSC 5X à 58°C puis 2 lavages successifs de 30 minutes en SSC 0,2X toujours à 58°C.

Les coupes sont ensuite incubées 30 minutes à température ambiante dans un tampon de saturation contenant du PBS1X additionné de 0,1% de BSA et de 2% de sérum normal de chèvre, pour bloquer les sites non spécifiques, avant d'être incubées 2 heures avec 100 μ L de tampon de saturation contenant 0,75 Unité d'un anticorps de mouton anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche Applied Science) en chambre humide à température ambiante. Après 2 lavages de 5 minutes en PBS1X, les coupes sont rincées 5 minutes en Tris-HCl 0,1M, pH 9,5. Les coupes sont révélées après incubation sur la nuit, à température ambiante, en chambre humide et à l'abri de la lumière avec un substrat de la phosphatase alcaline, le NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Roche Applied Science) en tampon 0,1M Tris pH 9,5, MgCl₂ 0,05M, NaCl 0,1M, selon les recommandations du fabricant. La réaction est stoppée le lendemain en rinçant les coupes 3 fois 5 minutes en PBS1X. Les coupes sont ensuite baignées 30 minutes dans de l'éthanol à 95% ce qui permet de fixer le marquage spécifique. La réaction de la phosphatase alcaline avec le NBT/BCIP donne un précipité de coloration bleue/violette.

2. Marquage immunohistochimique

Finalement, les coupes sont à nouveau saturées 30 minutes à température ambiante dans du PBS1X additionné de 0,5% de BSA et de 2% de sérum normal de chèvre (tampon de saturation), avant d'être incubées 1 heures avec l'anticorps anti-HLA-DR (Clone TAL.1B5, Abcam) dilué en tampon de saturation en chambre humide à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes en PBS1X, les coupes sont incubées 30 minutes, toujours en chambre humide, avec une goutte par coupe du Kit ImmPRESS™ (Vector Laboratories), qui contient un anti-IgG de souris couplé à la Peroxydase. Après 3 lavages de 5 minutes en PBS1X, la révélation s'effectue en incubant les coupes à température ambiante, en chambre humide et à l'abri de la lumière en utilisant le Kit ImmPACT™ AEC (Vector Laboratories), selon les recommandations du fabricant. La réaction est stoppée en rinçant les coupes en eau distillée. La réaction de la peroxydase avec l'AEC donne un précipité de coloration rouge.

Après plusieurs lavages dans de l'eau distillée, les lames sont déshydratées dans trois bains successifs d'alcool absolu puis trois bains d'histosol (environ une minute par bain). Les lames sont ensuite montées avec un milieu de montage non aqueux, le Vectamount (Vector Laboratories), pour observation au microscope.

V. Immunomarquage des coupes d'iléons en fluorescence et analyse des images

A. Immunomarquage

Les morceaux d'iléon inclus et congelés en OCT sont coupés à -20°C à l'aide d'un cryotome. Des coupes sériées d'une épaisseur de 7µm sont réalisées. Puis ces coupes sont positionnées sur des lames SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser). Après séchage des lames sur la nuit à température ambiante, les coupes sont fixées en PBS1X/paraformaldéhyde 2% 20 minutes à 4°C. Les coupes sont ensuite rincées en PBS1X et incubées 30 minutes à température ambiante dans un tampon de saturation contenant du PBS1X additionné de 5% de BSA et de 2% de sérum normal de chèvre. Les biotines endogènes sont alors bloquées à l'aide du Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories) selon les recommandations du fabricant. Les coupes sont ensuite incubées avec les différents anticorps primaires (**Tableau 6**) dilués dans du tampon de saturation supplémenté de 0,01% Tween20 en chambre humide sur la nuit à 4°C.

Anticorps	Isotype	Clone	Fournisseur	Concentration d'utilisation (µg/mL)
α-CD3	IgG de lapin	(polyclonal)	DAKO	2,5
α-CD4	IgG1 de souris	L200	BD Biosciences	5
α-CD8	IgG1 de souris	RPA-T8	BD Biosciences	5
α-HLA-DR	IgG2b de souris	TU36	BD Biosciences	0,1
α-macrophages	IgG1 de souris	PM-2K	AbD Serotec	0,5
α-CD68	IgG1 de souris	KP1	DAKO	4
α-DC-SIGN	IgG2b de souris	120507	R&D Systems	5
α-CD11c	IgG1 de souris	3.9	BioLegend	5
α-CD169	IgG1 de souris	HSn 7D2	Abcam	5
α-CD86	Ig2b de souris	IT2.2	BD Biosciences	2
α-Ki-67	IgG de lapin	(polyclonal)	Merck Millipore	Non spécifié (1/300)

Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés pour l'immunomarquage des coupes d'iléons

Après trois lavages en PBS1X supplémenté de 0,5% Tween20, les coupes sont incubées en chambre humide et dans le noir avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes ou des biotines (**Tableau 7**) également dilués en tampon de saturation supplémenté de 0,01% Tween20, pendant 30 minutes à température ambiante.

Anticorps	Isotype reconnu	Fluorochrome	Fournisseur	Concentration d'utilisation
Goat α -rabbit	Ig	Alexa-Fluor 546	Invitrogen	5 μ g/mL
Goat α -mouse	IgG1	Alexa-Fluor 488	Invitrogen	5 μ g/mL
Goat α -mouse	IgG1	Alexa-Fluor 546	Invitrogen	5 μ g/mL
Goat α -mouse	IgG2b	Alexa-Fluor 488	Invitrogen	5 μ g/mL

Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour l'immunomarquage des coupes d'iléons

Les coupes sont ensuite rincées par trois lavages successifs de 5 minutes en PBS1X supplémenté de 0,5% Tween20 puis à nouveau rincées en PBS1X seul. Les coupes sont finalement contre-colorées avec du 4,6-diamino-2-phénylindol (DAPI, Molecular Probes) et montées en Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) pour observation au microscope.

B. Microscopie et post-traitements

1. Acquisition des images brutes et reconstitution des mosaïques

Les micrographies ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal de type inversé équipé d'un spinning disk (LEICA DMI6000), d'une caméra couleur (CoolSnap HQ², Photometrics) et piloté par le logiciel Metamorph 7.7.5 (Molecular Devices). Les images ont été acquises à l'aide d'un objectif 20x de type HCX PL APO C (LEICA) à immersion. Une acquisition de 9 x 9 images est effectuée au meilleur plan focal pour chaque coupe et par couleur : bleu (DAPI), rouge (Alexa-Fluor 546) et vert (Alexa-Fluor 488). Cette acquisition utilisant la technologie « scanslide » nous permet de photographier la quasi-totalité de la coupe d'iléon.

Les 9 x 9 photographies brutes sont assemblées pour chaque couleur en une image finale à l'aide du logiciel image J.

2. Quantification de la surface marquée par surface analysée

Les cellules épithéliales et les lymphocytes intra-épithéliaux intercalés entre ces cellules sont manuellement exclus de l'image finale originale en DAPI. Cette manipulation nous permet de ne prendre en compte que la surface occupée par la lamina propria. La surface occupée par chaque marquage est quantifiée dans plusieurs zones de lamina propria mesurant au moins 0,1mm². Les lymphocytes T doublement marqués CD3⁺ CD4⁺ ou CD3⁺ CD8⁺ sont quantifiés via la présence du double marquage rouge et vert (pixels rouge + vert). Chaque quantification est réalisée de façon à prendre en compte le marquage le plus fidèlement possible.

Par animal, une surface totale d'au minimum 1,5 mm² de lamina propria a été analysée. La surface moyenne d'un lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺ a été déterminée d'après la mesure d'une centaine de cellules choisies aléatoirement dans la lamina propria. Cette donnée nous permet de déduire le nombre de lymphocytes T (CD3⁺ CD4⁺ or CD3⁺ CD8⁺) d'après la formule suivante:

$$\text{Nombre de lymphocytes marqués} = \frac{(\text{Surface totale marquée} / \text{surface totale analysée})}{\text{surface moyenne d'un lymphocyte}}$$

Toutes les analyses d'image sont réalisées à l'aide du logiciel Image J.

VI. Analyse des sous-populations lymphocytaires T par cytométrie en flux

Les sous-populations lymphocytaires ont été phénotypées à partir de sang total congelé (avant infection, après infection et le jour de l'autopsie) par cytométrie de flux avec un FACS CANTO II (BD Biosciences). Le sang est rapidement décongelé à 37°C puis repris en PBS1X supplémenté par 10% de SVF. Le surnageant est éliminé après 5 minutes de centrifugation. Le culot cellulaire est resuspendu en PBS1X supplémenté de 2% de SVF. Les marquages ont été réalisés sur environ 1 million de cellules dans un volume final de 100 µl. Pour cela, les cellules sont incubées 30 minutes à l'abri de la lumière à 4°C en présence des anticorps

dirigés contre les épitopes membranaires (**Tableau 8**). L'excès d'anticorps est ensuite éliminé par ajout de 3mL de PBS1X (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) et 5 minutes de centrifugation à 600g.

Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel BD DIVA. Tous les anticorps ont été titrés pour obtenir un ratio optimal signal/bruit de fond. Les « gates » ont été définies au moyen de la « fluorescence minus one » ou FMO, avec l'isotype contrôle correspondant à l'anticorps donné.

Pour obtenir le nombre de lymphocytes appartenant à chaque sous-population, le pourcentage de sous-populations positives obtenu en cytométrie est couplé au nombre absolu déterminé par l'hémogramme à l'aide d'un automate.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Dilution
α-CD3	Pe-Cy7	SP34/2	BD Pharmingen	1/30
α-CD4	PerCP-Cy5.5	L200	BD Pharmingen	1/50
α-CD8	PB	RPA-T8	BD Pharmingen	1/50
α-CD28	PE	CD28.2	BD Pharmingen	1/50
α-CD95	APC	DX2	BD Pharmingen	1/50
α-β7	Biotine	FIB504	BioLegend	1/200
α-CCR6	FITC	53130	R&D systems	1/16
α-CCR9	FITC	112509	R&D systems	1/16
α-CD49d (α4)	FITC	9F10	BioLegend	1/50
Streptavidin	PO		Molecular Probes	1/500

Tableau 8 : Anticorps utilisés pour l'analyse des sous-populations lymphocytaires T chez le macaque rhésus chinois

RESULTATS

I. Présentation des résultats

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à la compréhension de la physiopathologie de la phase aiguë de l'infection par le SIV dans le modèle du macaque rhésus chinois. Dans ce contexte, mon travail de doctorat s'est focalisé principalement sur l'infection du tractus gastro-intestinal. En conséquence, j'ai évalué l'expression des chimiokines par la muqueuse intestinale infectée. L'un des axes de recherche développé alors au laboratoire concernait l'impact de l'infection SIV sur la fonction thymique. J'ai également participé à ces travaux en mettant en évidence *in situ* l'expression de chimiokines dans le thymus des animaux. Basée sur des connaissances bibliographiques obtenues dans le modèle murin, ces travaux ont permis l'extrapolation de mécanismes connus chez la souris au modèle PNH et donc probablement à l'Homme. Ces résultats ont notamment révélé un impact de l'infection SIV sur la physiologie du thymus et ses conséquences sur le compartiment lymphocytaire T périphérique.

Puisqu'une partie de cette étude s'inscrit pleinement dans la démarche de réflexion de mon projet de doctorat, il me semble important de l'aborder. Ainsi, je commencerai ce chapitre des résultats par une première partie sur mon projet personnel de doctorat concernant l'impact de l'infection aiguë sur les lymphocytes T et macrophages de la muqueuse intestinale (**Etude n°1**). Puis, après une courte introduction intermédiaire, j'aborderai dans une seconde partie l'impact de l'expression des chimiokines par le thymus au cours des premiers jours après infection SIV chez le macaque rhésus chinois (**Etude n°2**).

II. Etude n°1

A. Introduction à l'étude n°1

Deux sous-espèces de macaque rhésus sont utilisées pour la recherche sur le VIH-1. D'origine géographique et de fond génétique distincts, les macaques rhésus originaires de l'Inde et de la Chine se distinguent par un développement pathogénique différent suite à l'infection expérimentale par le SIVmac₂₅₁. L'impact de l'infection du tractus gastro-intestinal, cible privilégié de la réplication virale, a été exploré chez les animaux d'origine indienne qui progressent très rapidement vers le SIDA. Dans ce modèle, une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ activés de la muqueuse a été mise en évidence dès le 7^e jour après infection par le SIVmac. Chez l'Homme chroniquement infecté par le VIH-1, le GALT jouerait un rôle central dans la pathogenèse en alimentant l'activation immune (Brenchley et al., 2006). La compréhension de l'atteinte du tractus intestinal en phase aiguë d'infection revêt donc une grande importance pour la mise en place de la pathologie.

Il est désormais reconnu que le macaque rhésus chinois infecté par le SIVmac mime plus fidèlement la physiopathologie de l'infection par le VIH-1 par rapport à son homologue indien infecté par le même isolat viral (Y. Zhou et al., 2013). Pourtant, les données de la littérature concernant la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ sont quasi-exclusivement basées sur l'étude du modèle macaque rhésus indien infecté par le SIVmac. De plus, la méthode la plus fréquemment utilisée est basée sur la dissociation du tissu muqueux, suivie de l'analyse des sous-populations lymphocytaires par cytométrie de flux. Ce protocole ne permet pas de dénombrer *in situ* les cellules de la muqueuse.

Dans une première partie, nous nous sommes attachés à évaluer la dissémination du virus dans la muqueuse intestinale des animaux d'origine chinoise au cours des 15 premiers jours suivant l'infection. Nous avons quantifié la propagation et la réplication du SIV dans les différents segments de l'intestin, du duodénum au colon et jusqu'au rectum.

Puis, en accord avec de précédentes observations de la littérature sur la difficulté d'estimer le nombre de lymphocytes T CD4 à partir de petites biopsies (Mehandru, 2004), nous avons noté l'hétérogénéité de la répartition de ces cellules dans les sites effecteurs de l'iléon. Pour contourner ce biais potentiel dans le comptage cellulaire, nous avons mis au point une méthode de quantification du nombre de lymphocytes CD3⁺ CD4⁺ sur de larges sections de 25mm². Cette méthode nous a permis d'estimer, sur des coupes entières, différentes sous-populations cellulaires de la lamina propria et de la sous-muqueuse de l'iléon.

En outre, le maintien du pool de lymphocytes T CD4⁺ périphériques est un élément central dans la pathologie chronique de l'infection par le VIH-1. Chez le macaque rhésus indien, une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ circulants rapide et soutenue a été mise en évidence pendant la phase aiguë de l'infection. Au contraire, la perturbation de l'homéostasie lymphocytaire périphérique est différente chez le macaque rhésus chinois et semble ressembler davantage à ce qui est observé chez l'Homme (Ling, Veazey, Luckay, et al., 2002a), (Monceaux et al., 2007).

Dans un second temps, nous avons donc analysé l'impact de l'infection par le SIV sur le pool de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ circulants les tous premiers jours après l'inoculation du SIVmac à nos animaux. Nous avons évalué le nombre absolu de ces cellules à partir du troisième jour jusqu'à deux semaines après l'inoculation du virus, à partir des données longitudinales des formules sanguines et d'analyses par cytométrie en flux.

Enfin, le tractus intestinal représentant certainement le plus grand compartiment lymphoïde du corps humain, nous avons cherché à évaluer les conséquences de la réplication virale intestinale sur l'homéostasie lymphocytaire T périphérique.

B. Etude n°1

Early changes of macrophages distribution and absence of CD4 T-cell depletion in the ileum mucosa during acute SIV infection in Chinese rhesus macaque

Running Head: Acute SIV infection in the Ileum

Rosalie PONTE^{a,b,c}, Magali RANCEZ^{a,b,c}, Suzanne FIGUEIREDO-MORGADO^{a,b,c}, Véronique FABRE-MERSSEMAN^{a,b,c}, Jacques DUTRIEUX^{a,b,c,d}, Bénédicte CHARMETEAU-DE MUYLDER^{a,b,c}, Rémi CHEYNIER^{a,b,c,*} and Anne COUËDEL-COURTEILLE^{a,b,c,d}

^aINSERM, U1016, Institut Cochin, Paris 75014, France. ^bCNRS, UMR8104, Paris 75014, France. ^cUniversité Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris 75014, France. ^dUniversité Paris Diderot, Paris 75013, France.

*Corresponding author: Rémi Cheynier, Institut Cochin, Département Immunité Infection Inflammation, 27 rue du Faubourg Saint Jacques 75014 Paris, France.

Phone: (33) 1 40 51 65 41; Fax: (33) 1 40 51 65 10, email: remi.cheynier@inserm.fr

This work was supported by ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales), SIDACTION, INSERM, CNRS and Université Paris Descartes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Objectives: Intestinal mucosa is one of the first target of Human/Simian Immunodeficiency Virus infections. Major depletion of gut-associated CD4⁺ T-cells that characterizes the acute phase of pathogenic SIV infection in Indian rhesus macaques is suspected to participate to the development of immune activation and pathogenesis. . We here analyzed the impact of acute SIV infection on macrophages and T-cell homeostasis in the gut of Chinese macaques, a more accurate model for HIV infection in humans.

Design and Methods: Rhesus macaques were intravenously infected with SIVmac₂₅₁ and bled every 2-3 days or necropsied at different early time-points post-infection as well as at day 65 and during late infection. Infection of the intestinal mucosa was quantified by qPCR. Immune cells were quantified in large sections of intestinal mucosa. Circulating T-cell subsets were followed by flow cytometry. Intestinal chemokine expressions were quantified by RT-qPCR.

Results: While infected cells became detectable in intestinal tissues by day 3, infection of the ileum occurs sooner and higher than in the other parts of the gut. However, in our model, no sign of CD4⁺ T-cell depletion could be observed during acute infection in this organ. In contrast, CD8⁺ T-cells counts were strongly increased during this period. Finally, macrophages were abundant in the ileum submucosa of the animals and re-localized to the lamina propria as early as 3 days post infection. Analysis of chemokine expression pattern in the infected ileum mucosa strongly suggested that CCL2, CCL5 and CXCL10 play a role in this macrophage migration while CCL19 and CCL25 attract circulating T-cells, participating to the initial lymphopenia that characterizes SIV infection.

Conclusions: CD4⁺ T-cells are not depleted in the ileum of acutely SIV-infected Chinese rhesus macaques. Chemokine-induced cell migrations within and to the gut mucosa may play a role in the establishment of SIV-specific mucosal immune responses.

Keywords: SIV, HIV, Gut, Ileum, chemokines, acute infection, physiopathology, Viral infection, CCL2, CCL5, CCL25, CCL19, CXCL10, Chinese rhesus macaque.

Introduction

Different animal models are currently used to study the physiopathology of HIV-1 infection. Aside from non-pathogenic models of natural or experimental infection such as SIVagm-infected African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) or SIVsmm-infected Sooty mangabeys (*Cercocebus atys*) [1, 2], different species of Asian macaques develop AIDS-related symptoms following experimental infection with SIVmac and serve as pathogenic models. However, these animals demonstrate highly diverse disease progression rates. *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) are mostly characterized by a slow development of AIDS, with long lasting low or undetectable viral loads and limited CD4⁺ T-cell depletion. They represent a good model of long-term non-progressor HIV-infected patients [3, 4]. In contrast, following SIVmac administration (whether systemic through intravenous injection or mucosal by contact with vaginal or rectal mucosae), rhesus macaques (*Macaca mulatta*) of Indian origin rapidly present high plasma viral loads and strong CD4⁺ T-cell depletion [5]. These animals develop symptoms within a few months and usually die of AIDS by 2 years. Finally, Chinese rhesus macaques present a more diverse evolution of the disease. A small proportion of rapid progressors develop symptoms similarly to Indian rhesus macaques while most of the animals remain asymptomatic for many years and classically die after 5 to more than 10 years following infection [6]. This model is presently considered by many authors as the most relevant to study the pathogenic manifestations that occur during both acute and chronic HIV infection in Humans [6-8].

Whatever the infection route, one of the first target tissue for HIV/SIV infection is the gastrointestinal tract [9, 10]. One of the most striking features of pathogenic SIV infection in Indian rhesus macaque is the rapid and sustained CD4⁺ T-cell depletion of the gut lamina propria (LP). Indeed, from the first 2 weeks of infection, CD4⁺CCR5⁺ T-cells quite completely disappear from the LP [11, 12].

This observation was at the origin of the “leaky gut” theory that suggests that from the onset of acute infection, of CD4-T cell impairment of gut-associated immune system, allowing bacterial translocation, triggers the chronic immune activation that characterizes HIV-infected patients [13]. However, the meaning of this early depletion of mucosal CD4⁺ T-cells remains unclear, as the same phenomenon is believed to occur during the acute phase of nonpathogenic SIV infections of sooty mangabeys [14] and African green monkeys [15]. In humans, such depletion was clearly observed during chronic HIV-infection [16] but, for obvious ethical reasons, the acute phase of HIV-infection remains barely studied. Only sparse observations in early chronic phase suggested similar depletion of gut-associated lymphoid tissues in humans [16-18]. However, most of these patients were identified and recruited in cohorts as they presented a symptomatic acute infection, a rare event in HIV-1 infection. Finally, contrarily to non-pathogenic SIV models, no CD4⁺ T-cell depletion was observed in non-progressor patients [19].

In the present work, we analyzed the evolution of gut mucosa T-cells and macrophages, during the acute phase of SIV infection in rhesus macaque of Chinese genetic background. We tested whether gut CD4⁺ T-cell population is maintained or affected in this model and comprehensively studied gut mucosa cell homeostasis during acute SIV_{mac251} infection.

Results

Earlier SIV replication in Ileum within the gastrointestinal tract

In order to analyze the impact of primary SIV infection in Chinese rhesus macaque, we first quantified viral DNA as well as viral RNA in samples taken from various parts of the intestine from macaques sacrificed at day 3, 7, 10 and 14 following intra-venous inoculation of SIVmac₂₅₁ (figure 1). Viral DNA was detectable in tissues, starting at day 3 pi, almost all samples being SIV DNA-positive by day 10 pi. Viral RNA was undetectable at day 3 and 7 in all the animals. At day 10, viral RNA was evidenced in the ileum at a higher rate than in the other part of the intestinal tract. All samples were positive at day 14. Similar analysis on lymph nodes (LN) tissue demonstrated that SIV replication in mesenteric LNs precedes that of peripheral LNs (axillary). In these organs, viral DNA was detected by day 3 while viral replication (presence of RNA) could be evidenced at day 10 (supplemental figure 1). These data suggest that the ileum is one of the first targets of SIV replication following systemic infection. Accordingly, we specifically concentrated on the consequences of SIV-infection in this organ.

Uneven T-cells distribution in the healthy ileum

Using confocal microscopy, we then analyzed T-cell distribution in in 25mm² gut mucosa tissue sections. A total of 42 LP zones from different samples from 2 healthy macaques were analyzed. Their surfaces ranged from 0.1 to 1 mm², representing a total of 18.1mm² analyzed (figure 2A). Despite a relatively constant cellular content as demonstrated by the proportion of mucosal surface occupied by nuclei (median 65.5% of total tissue surface range [45.2-81.4]; figure 2B), the surface covered by CD3 staining was highly variable between samples (median 6.18% [1.6-12.1]; figure 2C). Accordingly, 16 zones were stained for CD3 and CD4, 15 for CD3 and CD8 and 11 for CD3 and CD20 (figure 2D).

As expected from the CD3 staining, both CD4⁺ and CD8⁺ cell surfaces represented highly variable proportions of the LP (median=8.14% [3.85-20.6] and 2.82% [1.2-6.35] for CD4⁺ and CD8⁺ staining respectively; total LP surfaces analyzed: 8.5 and 5.4mm² respectively; figure 2D), demonstrating that an extensive analysis of large surfaces is mandatory to draw significant conclusions on cell infiltration in gut mucosae. Moreover, when analyzing double staining for either CD3 and CD4 or CD3 and CD8, it became clear that CD8⁺ T-cells represent about 70% [61%-75%] of the CD8⁺ staining, CD8⁺CD3⁻ cells most probably being NK cells. In contrast, CD4⁺CD3⁺ double staining only accounts for 44% [26%-73%] of CD4⁺ staining in the ileum LP, demonstrating that non-T-cells harboring CD4 expression represent a large proportion of gut CD4⁺ cells and must be analyzed separately (figures 2E and F).

Increased CD8⁺ T-cell but stable CD4⁺ T-cell numbers in the ileum during acute SIV infection

We then analyzed T-cell infiltration in the ileum LP from SIV-infected macaques sampled at 3, 7, 10, 14 and 65 days post-infection (2 animals per time point), as well as from one animal sacrificed while presenting AIDS-related symptoms. For each of these animals, 5 to 10 zones of LP were analyzed, representing surfaces of 3.06 to 9.35 mm² at any time point. Globally, the number of cells in LP, as defined by the relative surface occupied by nuclei, slightly declined at day 7 and day 65 as well as in the animal sacrificed at the AIDS stage of disease (median percentage of tissue surface occupied by nuclei = 62.6% in healthy animals, 58%, 42.6%, 53.2%, 65.8%, 41.4% and 44.1% at the different time points pi). As in uninfected macaques, important variations in surface staining for CD3, CD4 and CD8 were observed within the same tissue sections. However, a strongly significant increase of CD3 stained surface in the ileum LP was observed by day 7, reaching a maximum at day 65pi (figure 3A). In the animal presenting AIDS, CD3 staining returned to baseline value.

This increase over time during primary infection was almost exclusively due to enhancement of CD8⁺ T-cell numbers. Indeed, CD3⁺CD4⁺ T-cells statistically increased during acute infection and remained high all over the study. Of note, CD3⁺CD8⁺ cells quantifications performed on a few mucosal sections of ileum sampled at baseline, day 10 and day 14 demonstrated very similar values as compared to CD3⁺CD4⁺ staining (figure 3A).

Interestingly, when CD4 staining was analyzed alone, a significant increase in the proportion of stained surfaces was observed at day 3, followed by a progressive decrease leading to statistical significance at day 14 pi. CD4⁺ T-cells returned to baseline levels at day 65 and were strongly depleted in AIDS. However, CD3⁺CD4⁺ staining, that identifies CD4⁺ T-cells, remained constant at all studied time points up to day 65 (figure 3A). Only in the animal sacrificed for AIDS-related symptoms, was a significant depletion of ileum LP CD4⁺ T-cells observed (figure 3A).

In the same tissue sections, we also analyzed the different stainings in the submucosa. Despite lower cell concentrations at baseline (median percentage of tissue surface occupied by nuclei = 31.12% [26.8-63.6]), a strong decrease in cell number was observed by day 3 (9.6% [4.02-15.15] at day 3). Both CD3⁺CD4⁺ and CD4⁺CD3⁺ T-cells (CD8⁺ T-cells), which represent minor cell types in the uninfected submucosa, were significantly depleted during the first days of SIV infection (figure 3B).

Evolution of macrophages in the ileum mucosa

Considering that CD4⁺ T-cells were not depleted in the ileum of Chinese rhesus macaques during the acute phase of SIV-infection, the only CD4⁺ cell populations that accounted for the observed variations of CD4⁺ stained surfaces in both the LP and the submucosa were non-T-cells (CD3⁻). Interestingly, before infection, these cells were equally distributed between the submucosa and the LP, representing about 4% of total surface in both tissues (figure 4).

Following infection, CD4-expressing non-T-cells rapidly expanded/infiltrated the ileum LP during the first 3 days pi and then gradually declined. At day 14 pi, these cells were significantly less abundant in the LP than before infection (figure 4A). This effect was only transient in acute infection as CD3⁺CD4⁺ stained surfaces returned to baseline levels at day 65 pi. Finally, these cells were barely detectable in late stage disease (figure 4A).

Evolution of CD4⁺ non-T-cells was even more striking in the submucosa where CD4⁺CD3⁻ staining surface represents almost 80% of the cells in healthy individuals. In this tissue, the observed decline in cellularity was thus mostly due to the disappearance of CD4⁺ non-T-cells (figures 4B).

While CD3⁺ cells, whether they co-expressed CD4 or CD8 were round-shaped cells, CD4⁺CD3⁻ cells in both the LP and submucosa almost exclusively contained cells presenting dendrites (figure 4C; white arrows), suggesting that this population was composed of antigen-presenting cells (APCs). Indeed, a vast majority of the cells present in the submucosa expressed PM-2K, CD68, CD169 (Sialoadhesin/Siglec-1) and DC-SIGN and did not express CD11c marking them as macrophages (figure 4D). In healthy macaques, these cells barely expressed MamuLa-DR, CD83 and CD86 (B7-2) (figure 4D and data not shown) and did not proliferate as they are Ki67⁻ (data not shown).

Transient circulating T-cell depletion in acutely SIV-infected macaques

In parallel to tissue analysis, peripheral blood was longitudinally sampled from twelve monkeys followed for 3 weeks after SIV-infection. As we already shown in this group of SIV-infected Chinese rhesus macaques [20], circulating T-cell numbers dramatically dropped over the 10 first days of infection. This included CD4⁺ and CD8⁺ naive T-cell counts (CD95⁻CD28⁺), recent thymic emigrants (as defined by CD31⁺ naive CD4⁺ T-cells), central memory T-cells (TCM, CD95⁺CD28⁺) and effector memory T-cells (TEM, CD95⁺CD28⁻).

Following this initial drop, all T-cell populations raised again, naive CD4⁺ and CD8⁺, TCM CD8⁺ and TEM CD4⁺ reaching baseline values between day 10 and day 14, and subsequently plateaued (figure 5). The rapid fluctuation of circulating T-cell counts along acute SIV infection, and in particular the rebounds that followed the initial drop (between day 10 and 14), strongly suggest enhanced cell migration rather than virus-driven T-cell depletion. These migrations should be driven by local chemokine expressions in the different target organs. We thus analyzed this parameter in the gut of SIV-infected macaques as well as in other SIV-infected organs.

Strong chemokine responses characterize SIV infection in the ileum

The expression of 13 chemokine (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL28, CXCL8, CXCL10 and CXCL12) was quantified through real-time quantitative RT-PCR on tissue sampled from the gut of animals sacrificed at day 3, 7, 10 and 14 pi and compared to baseline values defined in 3 sacrificed healthy macaques. At baseline, a few chemokines were constitutively expressed in the ileum mucosa (CCL19, CCL21, CCL25, CCL28 and CXCL12; figure 6). The expression of these chemokines was weakly increased at both day 3 and 7 pi. Interestingly, at day 10, most of the tested chemokines demonstrated significantly enhanced expression in the infected ileum (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL25 and CXCL10; figure 6). These over-expressions almost vanished at day 14, except for CXCL10 which expression remained higher than before infection ($p=0.02$; figure 6).

At baseline, CCL4, CCL21, CCL25 and CXCL12 were specifically expressed in the duodenum and the jejunum while CCL4, CCL19, CCL21, CCL20, CCL28 and CXCL12 characterized chemokine expression in the colon and the rectum. The general overexpression of chemokines evidenced in the ileum at day 10 was not observed in the other parts of the small or in the large intestine (supplemental figures 2 and 3). Among the 13 tested chemokines, only CCL25 and CXCL10 demonstrated significantly increased expression in the duodenum (at day 7 and 14 respectively) while CCL19 was overexpressed in the colon at day 14 (supplemental figures 2 and 3).

Finally, while CCL4, CCL19, CCL21 and CXCL12 were identified in both axillary and mesenteric LNs sampled from non-infected monkeys, an increased expression was only observed for CXCL10 at day 10 post-infection (data not shown).

Increased IL-7 production specifically in the small intestine

We identified IL-7 as a potential signal triggering chemokine expressions in tissues [21]. Accordingly, we wondered whether this cytokine could be produced as a danger signal in response to acute SIV infection and identified in the infected tissues. IL-7 transcription was measured by RT-qPCR on the different tissues sampled from the infected and uninfected macaques. Interestingly, a significant increase in IL-7 transcription was evidenced by day 3 in the duodenum, jejunum and ileum (figure 7A). This enhancement vanished at day 14. In contrast, neither the colic mucosa nor the lymph nodes demonstrated significant enhancement of IL-7 transcription during acute SIV infection. Interestingly, in the small intestine, IL-7 mRNA concentrations directly correlated with CCL5, CCL25 and CXCL10 expressions (figure 7B).

Discussion

Gut CD4⁺ T-cell depletion is presently considered as a characteristic of both pathogenic HIV and SIV infections. This depletion was shown to occur very early after SIVmac₂₅₁ infection in the Indian rhesus macaque model [11, 22] as well as during primary infection in humans (around day 30) [16, 18]. Similarly, CD4⁺ T-cells in the GALT were described as severely depleted in non-pathogenic models of SIV infection [14, 15], which present high circulating viral loads during acute infection [23]. However, most of these data relies on flow cytometry analysis of cell subsets purified from intestinal tissues, rarely associated with cell counting after immunohistochemical staining of small biopsy samples [16-18]. We here showed that, even in healthy animals, cell distribution within gut mucosa is so heterogeneous that quantifications on large fields are mandatory to draw a complete picture of cell density in the different parts of the mucosa. Moreover, purification of GALT cells using mechanical and chemical treatments does not discriminate between cells within the LP and cells from the lymphoid follicles. Finally, a dramatic increase of CD8⁺ T-cells characterizes acute SIV infection in the gut, leading to diminished proportions of CD4⁺ T-cells, even if the absolute number of CD4⁺ T-cells is not affected. Accordingly, we developed an accurate assay to quantify CD4⁺ T-cells on large (25 mm²) sections of gut mucosa and used it to precisely evaluate the impact of SIVmac₂₅₁ infection on cell distribution in the intestinal mucosa. Using this technique, we did not observed any CD4⁺ T-cell depletion in Chinese rhesus macaques, a model that more closely mimics human pathology than Indian rhesus macaque [24]. Indeed, as in humans, blood CD4⁺ T-cell counts in SIV-infected Chinese rhesus macaques returned to baseline values by day 14 pi and remain high for several years before the development of AIDS that usually occurs 5-10 years after infection. In tissues, LP CD4⁺ T-cell depletion was clear in the animal sacrificed for AIDS-related symptoms.

This is in accordance with data generated from samples gathered during the chronic and AIDS phases of SIV-infection in Indian rhesus macaques and HIV-infected patients. Whether such depletion, that was associated to disease progression, is effectively present during early SIV infection in more pathogenic models such as the SIV-infected Indian rhesus macaque or in patients presenting symptomatic primary HIV infection remains to be fully established. However, the relationships between gut CD4⁺ LPL depletion, bacterial translocation, chronic immune activation and disease progression was recently questioned in the literature with the identification of damaged intestinal epithelial integrity due to gap-junctions defect as a possible cause of bacterial translocation, independently from CD4⁺ T-cell depletion [25]. We did not evidence any sign of damaged epithelial integrity in the studied animals. Finally, none of the animals sacrificed during the acute phase of the infection demonstrated any clinical symptom associated to acute infection (lymphadenopathy, splenomegaly, fever...) in SIV-infected Indian rhesus macaques [25].

The only depletion of intestinal CD4⁺ cells that we evidenced during acute infection concerned CD3⁻ cells located in the submucosa. Indeed, the CD4⁺ compartment in the GALT not only comprise CD3⁺ T-cells but also CD3⁻ APCs that represented roughly all the CD4⁺ cells located in the submucosa. These cells co-expressed macrophage-specific markers such as PM-2K, CD169/Siglec-1, CD68 and DC-SIGN but not CD11c. Similarly, CD68⁺DC-SIGN⁺ macrophages were identified in the distal colonic mucosa of HIV-infected patients [26]. In contrast, CD3⁻CD4⁺ cells barely expressed MamuLa-DR (figure 4D), CD83 and CD86 and did not proliferate in the tissues (Ki67; data not shown) at baseline. It can be expected that their hairy-shape make these cells more difficult to purify from intestinal tissues using chemical treatment than more round-shaped CD3⁺ T-cells.

Within the first days of SIV infection, CD4⁺ APCs quite completely disappeared from the submucosa, concomitantly to their increase in the LP. This suggests that, as a response to local infection, APCs migrated to re-localize near the epithelium, where the invading pathogens usually enter the mucosa from the intestinal lumen. It could thus be expected that danger signals triggered by the presence of viruses in the lamina propria stimulated the migration of APCs to the place where pathogens are suspected to cross the barrier in order to initiate cell mediated immunity. Among the chemokines that were overexpressed in the ileum of SIV-infected macaques, CCL2, CCL5 and CXCL10 are particularly efficient in attracting macrophages [27, 28]. It is important to notice that we detected CCL5 overexpression as early as 3 days pi, when macrophage migration was initiated, supporting this hypothesis. In addition, activated macrophages secrete, amongst other chemokines, CCL2, CCL5 and CXCL10, and thus can establish a positive feedback loop to attract new macrophages in the ileum [29, 30]. Interestingly, Chi and colleagues recently demonstrated a specific expression of CCL5 and CXCL10 by human gut epithelial cells following enterovirus infection [31]. The initial signal triggering activation of chemokine production by epithelial cells remains to be identified but on the one hand these cells are among the main IL-7 producers [32] and, on the other hand, we evidenced an overexpression of CD127, the IL-7R alpha chain, by TNF α -stimulated epithelial cell lines, making them more susceptible to IL-7 (data not shown). Similarly, E-Coli infection triggers IL-7R expression by human gut epithelial cell line [33]. It is thus probable that viral replication within the mucosa, through TNF α expression and increased susceptibility of epithelial cells to IL-7, leads to chemokine production by the epithelial barrier, attracting macrophages to the site of virus replication. The observed correlations between IL-7 production in the ileum and CCL5, CCL25 and CXCL10 expressions are in favor of the role of this cytokine in the initiation of chemokine production by the small intestine epithelium.

A functional analysis of these re-localized macrophages, as well as of their behavior following antigen encounter may help understanding their role in the establishment of anti-viral immune responses. Nevertheless, increased numbers of mucosal macrophages near the epithelium may participate in the preservation of the epithelial barrier integrity [34].

In parallel to their macrophage-homing potential, CCL2 and CCL5 also attract lymphocytes that usually express some of their specific receptors. Moreover, CCL25 and CCL19 were also strongly overexpressed in the ileum mucosa with a peak production observed at day 10 pi. These chemokines specifically attract gut-targeted T-cells that express CCR9 and CCR7. It can be expected that chemokine expressions in the ileum, that represents the largest intestinal surface, trigger T-cell homing to this mucosa and participate to the observed lymphopenia by day 10 pi. Despite large CD4⁺ T-cell depletion in blood, significant increase of cell numbers in the lamina propria is not expected as circulating T-cells only represent a small proportion of total CD4⁺ T-cells in the body (2.5%) while the GALT contains at least 10-fold more of these cells [35]. Subsequently, diminished chemokine expressions allow cells to migrate back leading to restoration of circulating cell counts. Whether the induction of chemokine expression and subsequent T-cell infiltration in the mucosa is beneficial or detrimental to the infected individual remains to be fully established. However, in the more pathogenic Indian model, Clay and colleagues demonstrated that local overexpression of CCL19, CCL25 and CXCL9 coincide with massive T-cell homing to the small intestine at day 14 pi in Indian rhesus macaques [36], suggesting that a smaller duration of chemokine response in the gut may be important for the preservation of intestinal CD4⁺ T-cells in Chinese rhesus macaques. Longer T-cell targeting to the infected gut may indeed lead to a more massive infection of gut-specific T-cells thus to rapid impairment of gut-associated immunity. Further investigations will be necessary to understand the blunting of chemokine productions in SIV-infected Chinese rhesus macaques.

Our data provide original evidences that acute SIV infection of rhesus macaques of Chinese genetic background induces deep but transient alterations in the ileum mucosa. Modifications of chemokine expression patterns lead to the macrophage recruitment to the lamina propria from the first days of infection. Local enhancement of CD8⁺ T-cell counts suggests the initiation of cellular immune responses. Contrarily to the more pathogenic model of Indian rhesus macaque, CD4⁺ T-cells were preserved during acute infection in Chinese monkeys.

Materials and methods

Monkeys, SIV infection and tissue sampling

Twenty adult rhesus macaques (*macaca mulatta*) of Chinese origin were intravenously inoculated with 50 AID₅₀ of the pathogenic SIVmac₂₅₁ isolate (provided by A.-M. Aubertin INSERM U544, Strasbourg, France). All the animals demonstrated plasma SIV viral load by day 3-5.

Blood from the twenty animals was longitudinally sampled every 3-4 days for 3 weeks following infection (10mL on EDTA). Eleven SIV-infected macaques were euthanatized at day 3 (n=3), 7 (n=2), 10 (n=2), 14 (n=2) and 65 (n=2) pi by i.v. injection of pentobarbital (10mL). Moreover, an SIV infected macaque presenting with AIDS-related symptoms (weight loss, cachexia and prostration) was euthanized one-year pi. Uninfected healthy animals (n=3) served as controls. The 4 animals sacrificed at day 10 and 14 pi as well as one animal sacrificed with AIDS-related symptoms were included in the longitudinal blood sample analysis. Organs were collected at necropsy. Small intestine (duodenum, jejunum and ileum), colonic and rectal tissues used in this current study were either frozen for further DNA and RNA extraction or included in OCT compound (Labonord, Templemars, France) and immediately snap frozen.

All manipulations were realized under anesthesia (tiletamine/zolasepam; 4.6mg/kg). The animal experimentation ethical committee Paris 1 approved this study (n°2011-0001).

Real-time PCR quantification of IL-7 and chemokines

Each piece of tissue (20 to 30mg) was homogenized with TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France) using 2 cycles of 2 minutes at 30 Hz prior to RNA extraction. Total mRNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) according the manufacturer's protocol. A reverse transcription step was performed using the QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen). Specific cDNAs were PCR amplified using "outer" 3'/5' primer pairs (10 minutes initial denaturation at 95°C, 22 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 3 minutes at 72°C). Each target was co-amplified together with HPRT sequences, as housekeeping gene, for each sample. Target mRNA and HPRT were then quantified on each of these PCR products in LightCycler® experiments performed on 1/280th of the PCR products using "inner" 3'/5' primer pairs in LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR cycling program consisted of 10 minutes initial denaturation at 95°C, 40 cycles of 10 second at 95°C, 6 seconds at 64°C, and 15 seconds at 72°C; fluorescence measurements were performed at the end of elongation steps. Plasmids of known concentration containing one copy of both HPRT and target amplicon were used as standard curves. IL-7, chemokines and HPRT mRNA quantifications were performed in independent experiments using the same first-round serial dilution standard curve. Quantifications were made in triplicate for all samples studied. Target mRNA concentration was normalized to HPRT mRNA in each sample. The results were expressed as absolute numbers of target mRNA copies per HPRT mRNA copy. IL-7 and chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL28, CXCL8, CXCL10 and CXCL12) primers are described in table 1.

Viral and proviral quantifications

A similar quantification method was used to quantify total SIV RNA using Gag-specific primers (table 2)

For DNA isolation, tissues were lysed in Tween-20 (0.05%), Nonidet P-40 (0.05%) and proteinase K (100µg/ml) for 30min at 56°C, then 15min at 98°C.

SIV DNA was directly quantified from the lysate using Gag specific primers (table 2). Gag sequence was amplified together with the CD3γ chain in triplicate using the “outer” 3’/5’ primer pairs using the same conditions as described above. PCR products were diluted 10-fold and quantified by real-time PCR in JumpStart mix (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) with 1pmole of probes and 24pmoles of the ‘inner’ 3’/5’ primer pairs indicated in table 2. As standard curves, we used plasmids containing one copy of both the CD3 and Gag amplicon. The results were expressed as absolute number of HIV copies per 10⁵ cells.

Immunohistofluorescent staining

7µm ileum cryosections collected on SuperFrost® Plus slides (Thermo Scientific Menzel) were fixed for 10 minutes at 4°C in acetone/methanol (50/50), rinsed in PBS and blocked with 5% BSA/ 2% normal goat serum in PBS at RT for 30 minutes. Sections were incubated in humid chamber overnight at 4°C with primary antibodies. Sections were then rinsed in 0.5% Tween20/PBS, incubated at RT in the dark for 30 minutes with secondary antibodies and rinsed in 0.5% Tween20/PBS. Finally, sections were washed in PBS alone, counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France), and mounted in Fluoromount-G medium (Southern Biotechnology, Birmingham, AL).

Primary antibodies: polyclonal rabbit anti-CD3 (DAKO, Trappes, France), mouse anti-CD4 (clone L200, IgG1, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), mouse anti-CD4 (clone OKT4, IgG2b, BioLegend, Saint Quentin Yvelines, France), mouse anti CD8 (clone RPA-T8, IgG1, BD Biosciences), mouse anti-CD20 (clone L26, IgG2a, DAKO), mouse anti-HLA-DR (clone TAL.1B5, IgG1, DAKO), mouse anti-macrophages (clone PM-2K, IgG1, AbD Serotec, Düsseldorf, Germany), mouse anti-DC-SIGN (clone 120507, IgG2b, R&D Systems, Lille, France), mouse anti-CD68 (clone KP1, IgG1, DAKO), mouse anti-CD11c (clone 3.9, IgG1, BioLegend), mouse anti-CD169 (clone HSn 7D2, IgG1, Abcam, Paris, France), mouse anti-CD86 (clone IT2.2, IgG2b, BD Biosciences), mouse anti-CD83 (clone HB15A, IgG2b, Beckman Coulter – Immunotech, Marseille, France), and mouse anti-Ki67 (clone MIB-1, IgG1, DAKO).

Secondary antibodies: Alexa Fluor® 546- or 488-conjugated goat anti-rabbit, Alexa Fluor® 546- or 488-conjugated goat anti-mouse IgG1 or IgG2b (Molecular Probes).

Quantitative image analysis

Images were digitally acquired with an inversed Spinning Disk confocal microscope (LEICA DMI6000) equipped with a color camera (CoolSnap HQ², Photometrics) and the Metamorph 7.7.5 software (Molecular Devices), using a 20x HCX PL APO C Objective (LEICA). 25mm² image of each section was acquired at the best focus using the scanslide technology.

In order to count LPL (lamina propria lymphocytes) only, IEC (intestinal epithelial cells), IEL (intraepithelial lymphocytes) and lymphoid follicles were manually excluded from the original DAPI stained image. The surface of green and red staining was quantified in different zones of LP measuring at least 0.1mm². For counting of dually labeled CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ T-cells, we quantified only the co-stained surface (red plus green pixels). Per animal, a total surface of at least 1.5 mm² of LP was analyzed.

The average surface of one stained CD4⁺ T-cell was determined by measuring a hundred of cells in the LP. Thus, the number of T-cells (CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺) is given by the formula: (total stained surface / total surface analyzed) / average surface on one T-cell.

Image analyses were performed using Image J software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Polychromatic flow cytometry analysis and assessment of absolute peripheral T-cell numbers

Fluorochrome-conjugated antibodies used for polychromatic flow cytometry analysis were anti-CD3-PE-Cy7 (clone SP34-2), anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone L200), anti-CD8-PB (clone RPA-T8), anti-CD95-APC (clone DX2), anti-CD28-PE (clone CD28.2) (BD Pharmingen).

Peripheral cell phenotype was analyzed from frozen blood by flow cytometry and sorted using a BD FACS CANTO II (BD Biosciences). Flow cytometry analyses were performed using BD Diva software (BD Biosciences). For multicolor analysis, all antibodies were titrated for an optimal signal/noise ratio and gates were established using fluorescence minus one and isotype controls. To derive the absolute value of each subset, the percentage of positive cell subsets obtained by cytometry was coupled to the absolute cell count obtained by automated hematology analyzer.

References

1. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat AS, Kunkel D, Petitjean G, *et al.* Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* 2009,**119**:3544-3555.
2. Bosinger SE, Jacquelin B, Benecke A, Silvestri G, Muller-Trutwin M. Systems biology of natural simian immunodeficiency virus infections. *Curr Opin HIV AIDS* 2012,**7**:71-78.
3. Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, Lebon P, Nascimbeni M, Perie L, *et al.* Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 2008,**112**:4598-4608.
4. Mannioui A, Bourry O, Sellier P, Delache B, Brochard P, Andrieu T, *et al.* Dynamics of viral replication in blood and lymphoid tissues during SIVmac251 infection of macaques. *Retrovirology* 2009,**6**:106.
5. Mattapallil JJ, Letvin NL, Roederer M. T-cell dynamics during acute SIV infection. *AIDS* 2004,**18**:13-23.
6. Trichel AM, Rajakumar PA, Murphey-Corb M. Species-specific variation in SIV disease progression between Chinese and Indian subspecies of rhesus macaque. *J Med Primatol* 2002,**31**:171-178.
7. Monceaux V, Viollet L, Petit F, Cumont MC, Kaufmann GR, Aubertin AM, *et al.* CD4⁺ CCR5⁺ T-cell dynamics during simian immunodeficiency virus infection of Chinese rhesus macaques. *J Virol* 2007,**81**:13865-13875.
8. Zhou Y, Bao R, Haigwood NL, Persidsky Y, Ho WZ. SIV infection of rhesus macaques of Chinese origin: a suitable model for HIV infection in humans. *Retrovirology* 2013,**10**:89.
9. Couedel-Courteille A, Butor C, Juillard V, Guillet JG, Venet A. Dissemination of SIV after rectal infection preferentially involves paracolic germinal centers. *Virology* 1999,**260**:277-294.
10. Ribeiro Dos Santos P, Rancez M, Pretet JL, Michel-Salzat A, Messent V, Bogdanova A, *et al.* Rapid dissemination of SIV follows multisite entry after rectal inoculation. *PLoS One* 2011,**6**:e19493.
11. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvets DE, Pauley DR, Knight HL, *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4⁺ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998,**280**:427-431.
12. Kewenig S, Schneider T, Hohloch K, Lampe-Dreyer K, Ullrich R, Stolte N, *et al.* Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology* 1999,**116**:1115-1123.
13. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006,**7**:235-239.
14. Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, Brenchley JM, Milush JM, Engram JC, *et al.* Severe depletion of mucosal CD4⁺ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol* 2007,**179**:3026-3034.
15. Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, Brenchley JM, Butler IF, Pattison M, *et al.* Acute loss of intestinal CD4⁺ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol* 2007,**179**:3035-3046.
16. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004,**200**:761-770.
17. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, *et al.* Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human

- immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003,**77**:11708-11717.
18. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004,**200**:749-759.
 19. Ciccone EJ, Greenwald JH, Lee PI, Biancotto A, Read SW, Yao MA, *et al.* CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* 2011,**85**:5880-5888.
 20. Dutrieux J, Fabre-Mersseman V, Charmeteau-De Muylder B, Rancez M, Ponte R, Rozlan S, *et al.* Modified interferon-alpha subtypes production and chemokine networks in the thymus during acute simian immunodeficiency virus infection, impact on thymopoiesis. *AIDS* 2014.
 21. Beq S, Rozlan S, Gautier D, Parker R, Mersseman V, Schilte C, *et al.* Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood* 2009,**114**:816-825.
 22. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, *et al.* Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005,**434**:1148-1152.
 23. Pandrea I, Silvestri G, Onanga R, Veazey RS, Marx PA, Hirsch V, *et al.* Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences. *J Med Primatol* 2006,**35**:194-201.
 24. Ling B, Veazey RS, Luckay A, Penedo C, Xu K, Lifson JD, *et al.* SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS* 2002,**16**:1489-1496.
 25. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, *et al.* Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog* 2010,**6**:e1001052.
 26. Preza GC, Tanner K, Elliott J, Yang OO, Anton PA, Ochoa MT. Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014,**30**:241-249.
 27. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, *et al.* Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012,**61**:416-426.
 28. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004,**25**:677-686.
 29. Veckman V, Miettinen M, Matikainen S, Lande R, Giacomini E, Coccia EM, *et al.* Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol* 2003,**74**:395-402.
 30. Anton K, Banerjee D, Glod J. Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion. *PLoS One* 2012,**7**:e35036.
 31. Chi C, Sun Q, Wang S, Zhang Z, Li X, Cardona CJ, *et al.* Robust antiviral responses to enterovirus 71 infection in human intestinal epithelial cells. *Virus Res* 2013,**176**:53-60.
 32. Madrigal-Estebas L, McManus R, Byrne B, Lynch S, Doherty DG, Kelleher D, *et al.* Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express

- two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol* 1997,**58**:83-90.
33. Yamada K, Shimaoka M, Nagayama K, Hiroi T, Kiyono H, Honda T. Bacterial invasion induces interleukin-7 receptor expression in colonic epithelial cell line, T84. *Eur J Immunol* 1997,**27**:3456-3460.
 34. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,**102**:99-104.
 35. Ganusov VV, De Boer RJ. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol* 2007,**28**:514-518.
 36. Clay CC, Rodrigues DS, Harvey DJ, Leutenegger CM, Esser U. Distinct chemokine triggers and in vivo migratory paths of fluorescein dye-labeled T Lymphocytes in acutely simian immunodeficiency virus SIVmac251-infected and uninfected macaques. *J Virol* 2005,**79**:13759-13768.

Figure legends

Figure 1: Quantification of RNA and DNA viral loads in the gut of acutely infected Simian rhesus macaques.

Intestinal tissues were sampled at necropsy in macaques sacrificed at day 3, 7, 10 and 14 following SIV_{mac251} infection. SIV (Gag gene) RNA (open symbols) and DNA (close symbols) were quantified by nested RT-qPCR and nested qPCR respectively. At each time point, each symbol represents an individual animal, similar symbols representing different tissue samples. Data are presented as SIV-RNA copies per HPRT copy and SIV-DNA copies per 10⁵ cells (estimated by quantification of CD3 γ gene). Medians are shown as horizontal bars. The hatched zone delimitates the limits of detection. *COL A: Ascending colon; COL D: Descending colon.*

Figure 2: Highly heterogeneous T-cell distribution in the lamina propria of healthy macaques ileum

Ileum tissues sampled from healthy Chinese rhesus macaques were labeled using anti-CD3 and anti-CD4 (L200) or CD8 or CD20 antibodies, nuclei were labeled using DAPI. For each tissue section, different zones of the lamina propria were defined. Their surfaces are shown on top panel (A). The proportion of the analyzed surfaces occupied by DAPI (B), anti-CD3 (C) and either CD4, CD8 or CD20 (D) labeling are shown for each zone analyzed individually. The percentage of CD3⁺CD8⁺ labeled surface within CD8⁺ surfaces as well as CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD4⁺ within CD4⁺ surfaces were calculated for each individual LP zone (E). Representative examples of LP staining with anti-CD3 (red) and anti-CD4 (green) (top panel) and anti-CD3 (red) and anti-CD8 (green) (bottom panel) are shown (F). Arrows identify CD4⁺ non-T-cells and arrowheads indicate either CD4⁺ or CD8⁺ T-cells. *H-LP-4-1.1: H: Healthy, LP: Lamina Propria, 4:anti-CD4 labeling, 1.1: first tissue section, first zone.*

Figure 3: Evolution of T-cell subsets in acutely SIV-infected Chinese rhesus macaques ileum

Ileum tissues sampled from healthy Chinese rhesus macaque as well as from macaques euthanized at day 3, 7, 10 and 14 post-SIV infection (2 animals per time point) were labeled using anti-CD3 and anti-CD4 (L200) monoclonal antibodies. The proportions of LP (A) or submucosa (B) tissues occupied by the different labeling are represented as medians and standard deviations for each time points. Five to 10 different zones were quantified on each tissue section and account for the entire LP or submucosa identified. CD8 cells were quantified as CD3⁺CD4⁻ cells. Thin bars on the CD8 (CD3⁺CD4⁻) graph for the LP represent quantifications of CD8⁺ cells performed on tissue sampled at day 0, 10 and 14 pi. Statistical differences as compared to baseline values are shown (Mann-Whitney one-tail U test; *:p<0.05, **:p<0.01).

Figure 4: Evolution and identification of CD4⁺CD3⁻ cells in of acutely SIV-infected Chinese rhesus macaques ileum

Ileum tissues sampled from healthy Chinese rhesus macaque as well as from macaques euthanized at day 3, 7, 10 and 14 post-SIV infection (2 animals per time point) were labeled using anti-CD3 and anti-CD4 monoclonal antibodies. The proportions of LP (A) or submucosa (B) tissues occupied by the CD3⁻CD4⁺ cells are represented as medians and standard deviations for each time points. Five to 10 different zones were quantified on each tissue section and account for the entire LP or submucosa identified. Statistical differences as compared to baseline values are shown (Mann-Whitney one-tail U test; *:p<0.05, **:p<0.01). (C) Representative examples of labeled ileum mucosa for CD3 (red) and CD4 (green) from healthy macaques (left panel) and SIV-infected macaque day 3 pi are shown (right panel).

Arrows identify CD4⁺ non-T-cells. (D) Representative examples of samples from healthy macaques stained for PM-2K, CD68, CD11c, CD169/Siglec-1, DC-SIGN and MHC-II MamuLa-DR (red), together with CD4 (green) are shown. In all pictures, nuclei are labeled in blue with DAPI. *LP: Lamina Propria; SM: Submucosa; BV: Blood Vessel; M: Muscular tissue.*

Figure 5: Longitudinal analysis of T-cell subsets in SIV-infected rhesus macaques.

Circulating naive (A), central memory (TCM; B) and effector memory (TEM; C) CD4⁺ (Top panels) and CD8⁺ (Bottom panels) T-cells were quantified in peripheral blood cells from SIV-infected rhesus macaques over the first 3 weeks of infection (n=12). *: p<0.05 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

Figure 6: Chemokine expression pattern in the ileum mucosa in acutely SIV infected Chinese rhesus macaques.

The expression of 13 chemokines was quantified by RT-qPCR in ileum tissues sampled at day 0, 3, 7, 10 and 14 pi (chemokine mRNA copies per HPRT mRNA copy). For each time point, each color represents an animal, 2 samples per animal. The black line on day 3, 7, 10 and 14 graphs represent the median of healthy individuals. Statistical differences as compared to healthy monkeys are shown for each individual chemokine (Mann-Whitney one-tail U test; *:p<0.05, **:p<0.01).

Figure 7: IL-7 expression in the gut of SIV-infected macaques

A, IL-7 mRNA concentration was quantified by RT-qPCR in tissue sampled at day 3, 7, 10 and 14 pi (IL-7 mRNA copies per HPRT mRNA copy). Statistical differences as compared to healthy monkeys (*) or to D10 monkeys (#) are shown (Mann-Whitney one-tail U test; *:p<0.05, **:p<0.01, #:p<0.01). B, Correlations between IL-7 mRNA concentration and CCL5 (left panel), CCL25 (central panel) or CXCL10 (right panel) mRNA concentrations in the small intestinal mucosa. Each point represents one individual sample from the jejunum, duodenum and ileum, shown in light grey, dark grey and black, respectively. Regression lines for all the samples, Spearman's rank correlation value and associated probability are shown.

Supplemental figure 1: Quantification of RNA and DNA viral loads in the lymph nodes of acutely infected Simian rhesus macaques.

Mesenteric and axillary lymph nodes were sampled at necropsy in macaques sacrificed at day 3, 7, 10 and 14 following SIV_{mac251} infection. SIV (Gag gene) RNA (open symbols) and DNA (close symbols) were quantified by nested RT-qPCR and nested qPCR respectively. At each time point, each symbol represents an individual animal, similar symbols representing different tissue samples. Data are presented as SIV-RNA copies per HPRT copy and SIV-DNA copies per 10⁵ cells (estimated by quantification of CD3 γ gene). Medians are shown as horizontal bars. The hatched zone delimitates the limits of detection.

Supplemental Figure 2: Chemokine expression pattern in duodenum and jejunum mucosae in acutely SIV-infected Chinese rhesus macaques.

The expression of 12 chemokines was quantified by RT-qPCR in tissues sampled at day 0, 3, 7, 10 and 14 pi (chemokine mRNA copies per HPRT mRNA copy). For each time point, each color represents an animal, 2 samples per animal. The black line on day 3, 7, 10 and 14 graphs represent the median of healthy individuals. Statistical differences as compared to healthy monkeys are shown for each individual chemokine (Mann-Whitney one-tail U test; *:p<0.05, **:p<0.01).

Supplemental Figure 3: Chemokine expression pattern in colon and rectum mucosae in acutely SIV-infected Chinese rhesus macaques.

The expression of 12 chemokines was quantified by RT-qPCR in tissues sampled at day 0, 3, 7, 10 and 14 pi (chemokine mRNA copies per HPRT mRNA copy). For each time point, each color represents an animal, 2 samples per animal. The black line on day 3, 7, 10 and 14 graphs represent the median of healthy individuals. Statistical differences as compared to healthy monkeys are shown for each individual chemokine (Mann-Whitney one-tail U test; *:p<0.05, **:p<0.01).

Table 1: Oligonucleotides used for chemokine and IL-7 mRNA real-time PCR quantification

Name	Sequence	Name	Sequence
HPRT-Out5	CTGAACGTCTTGCTCGAGAT	HPRT-In5	CACATTGTAGCCCTCTGTGT
HPRT-Out3	CGACCTTGACCATCTTTGGA	HPRT-In3	CTGACCAAGGAAAGCAAAGT
CCL2-Out5	AACATCCAGTGCTCAAAGTGAA	CCL2-In5	CTGCTCATAGCAGCCACCTTCA
CCL2-Out3	TCCAGGTGGTCCATGGAAT	CCL2-In3	TCCTGAACCCACTTCTGCTT
CCL3-Out5	CATTCCATCACCTGCTCAGAA	CCL3-In5	CAACCGGATCTCAGCAACAT
CCL3-Out3	TCCAGGTGCTGACGTATTT	CCL3-In3	GCCGGCCTCTCTTGTTA
CCL4-Out5	CCATGAAGCTGCGCGTGA	CCL4-In5	CCCACCTCTGCTGCTT
CCL4-Out3	CTCAGTTCAGTTCAGGTCA	CCL4-In3	GCAGACTTGCTTCCCTCTTTT
CCL5-Out5	GCTGTCATCCTCGTTGCTA	CCL5-In5	ACATGCCTCAGACACCACA
CCL5-Out3	CTCATCTCCAAAGAGTTGATGTA	CCL5-In3	TACTCCCGAACCCATTCTT
CCL11-Out5	TGAAGGTCTCCACAACACT	CCL11-In5	TGCAACCACCTGCTGCTTCA
CCL11-Out3	TGGCTTTGGAGTTGGAGAT	CCL11-In3	TTGGAGATTTTCGGTCCAGATA
CCL19-Out5	ACCGTTGGCCTGCCTCTGTT	CCL19-In5	CAGCCTGCTGGTTCTCTGGA
CCL19-Out3	CTGCTGCGGCGCTTCATCTT	CCL19-In3	TCCTCTGCAGTCTCTGGAT
CCL20-Out5	CCATGTGCTGTACCAAGAGT	CCL20-In5	TTGCTCCTGGCTGCTTTGA
CCL20-Out3	TGCTGAGGCGACGTACAATA	CCL20-In3	CCCAGGTCTGCTTTGGATT
CCL21-Out5	CCTCAGCTCTGGCCTCTTA	CCL21-In5	ATGGCTCAGTCACTGGCTCT
CCL21-Out3	TCACTGGGCTATGGCCCTTCA	CCL21-In3	CTATGGCCCTTTAGGGGTCT
CCL25-Out5	CACACCCAAGGTGCTTTTGA	CCL25-In5	TTATCGGATCCAGGAGGTGA
CCL25-Out3	TTAGCTGATGTCAGGAGGGA	CCL25-In3	CTGCTGGTGGGATTGCTAAA
CCL28-Out5	AAGGCTCCTGGAAGAGTGAA	CCL28-In5	TCGCATCCAGAGAGCTGAT
CCL28-Out3	GTTTCGTGTTTCCCTGATGT	CCL28-In3	CTGATGTGCCCTGTTACTGT
CXCL8-Out5	GAACCATCTCGCTCTGTGTA	CXCL8-In5	ATCTCGCTCTGTGTAAACATGA
CXCL8-Out3	GCTCTCTTCCATCGGAAAGT	CXCL8-In3	CTGTATTGGCACAGTGTGGT
CXCL10-Out5	TGATTTGCTGCCTTGTCTTTCT	CXCL10-In5	CTCTCTCAAGAACTGTACGCT
CXCL10-Out3	ACCTCTTCTCACCTTCTTTT	CXCL10-In3	CATGTGGACAAAATTGACTTGGA
CXCL12-Out5	GTCAGCCTGAGCTACAGAT	CXCL12-In5	TACAGATGCCCATGCCGATT
CXCL12-Out3	TTTCTCCAGGTACTCCTGAA	CXCL12-In3	TCGGGTCAATGCACACTTGT
IL-7-Out5	TTTGGACTTCTCCCTGAT	IL-7-In5	CCCCTGATCCTTGTCTGTT
IL-7-Out3	GTGTTCTTTAGTGCCCATCAAAAT	IL-7-In3	GCGAGCAGCACGGAATAAAA

Table 2: Oligonucleotides used for SIV-DNA real-time PCR quantification

Name	Sequence	Name	Sequence
CD3-Out5	ACTGACATGGAACAGGGGAA	CD3-In5	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3-Out3	AGCTCTGAAGTAGGGAACATAT	CD3-In3	TTCCTGGCCTATGCCCTTTT
Gag-SIV-Out5	CAACAAGGACAGCTTAGGGA	Gag-SIV-In5	CCGTCAGGATCAGATATTGCA
Gag SIV-Out3	TTGACAGGCCGTCAGCATT	Gag SIV-In3	GAAACTATGCCAAAAACAAGT

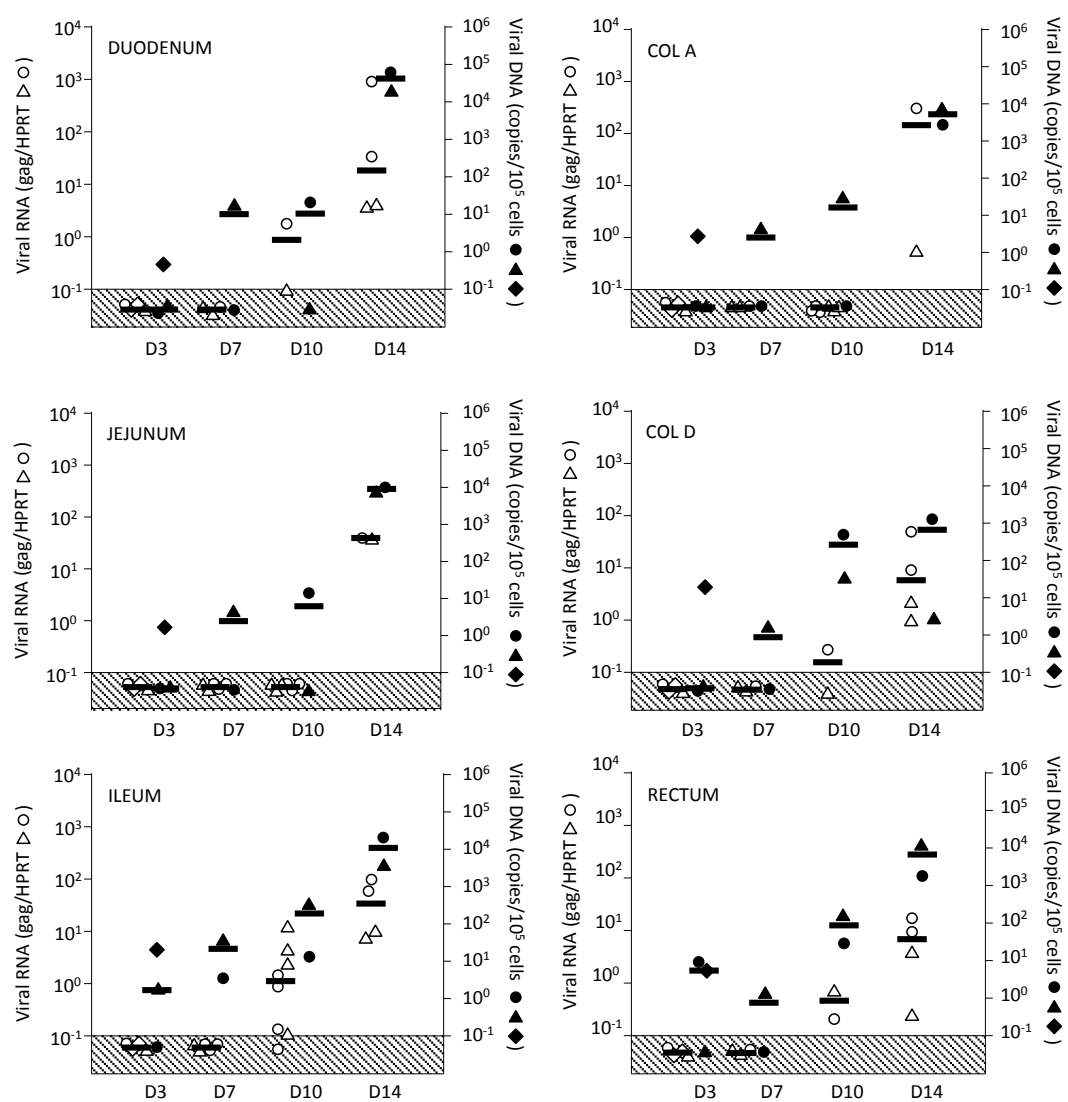


Figure 1

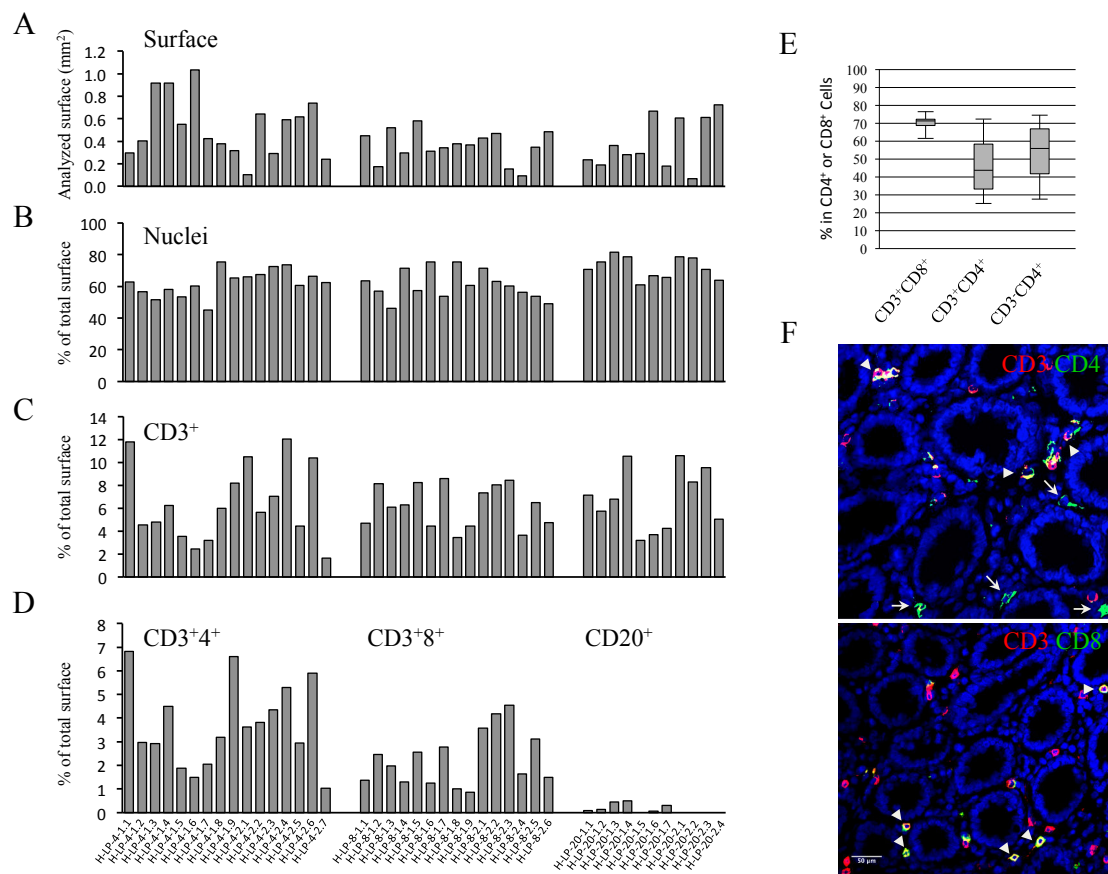


Figure 2

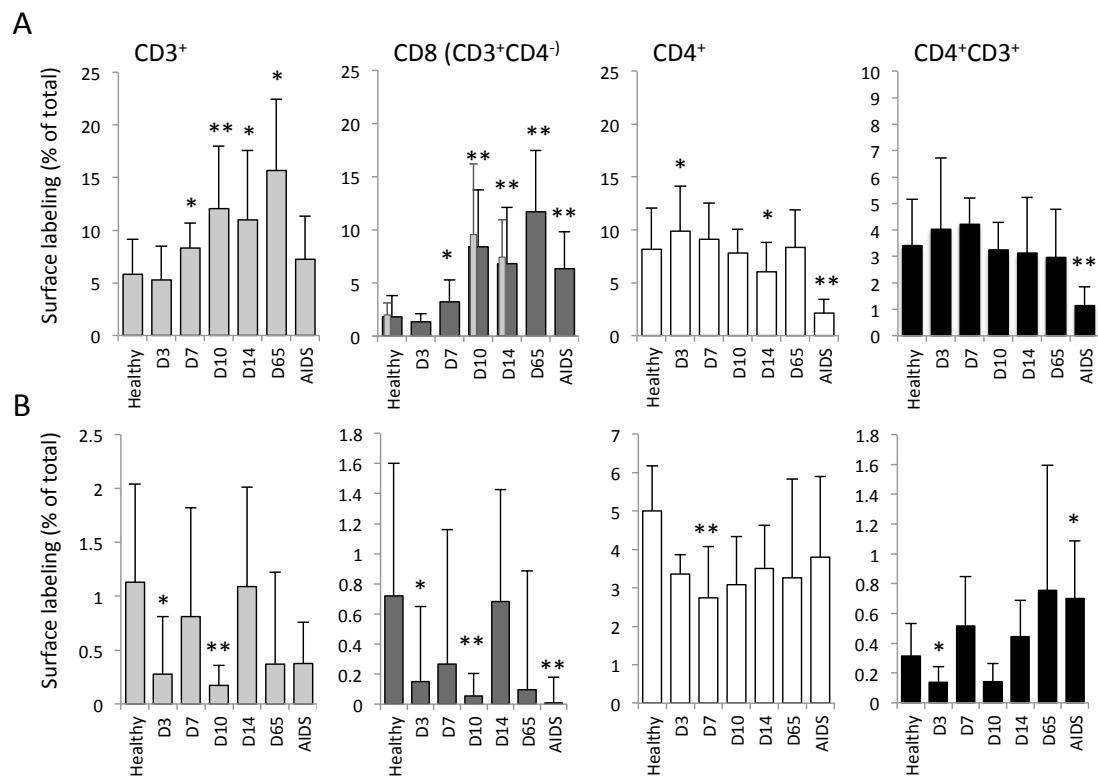


Figure 3

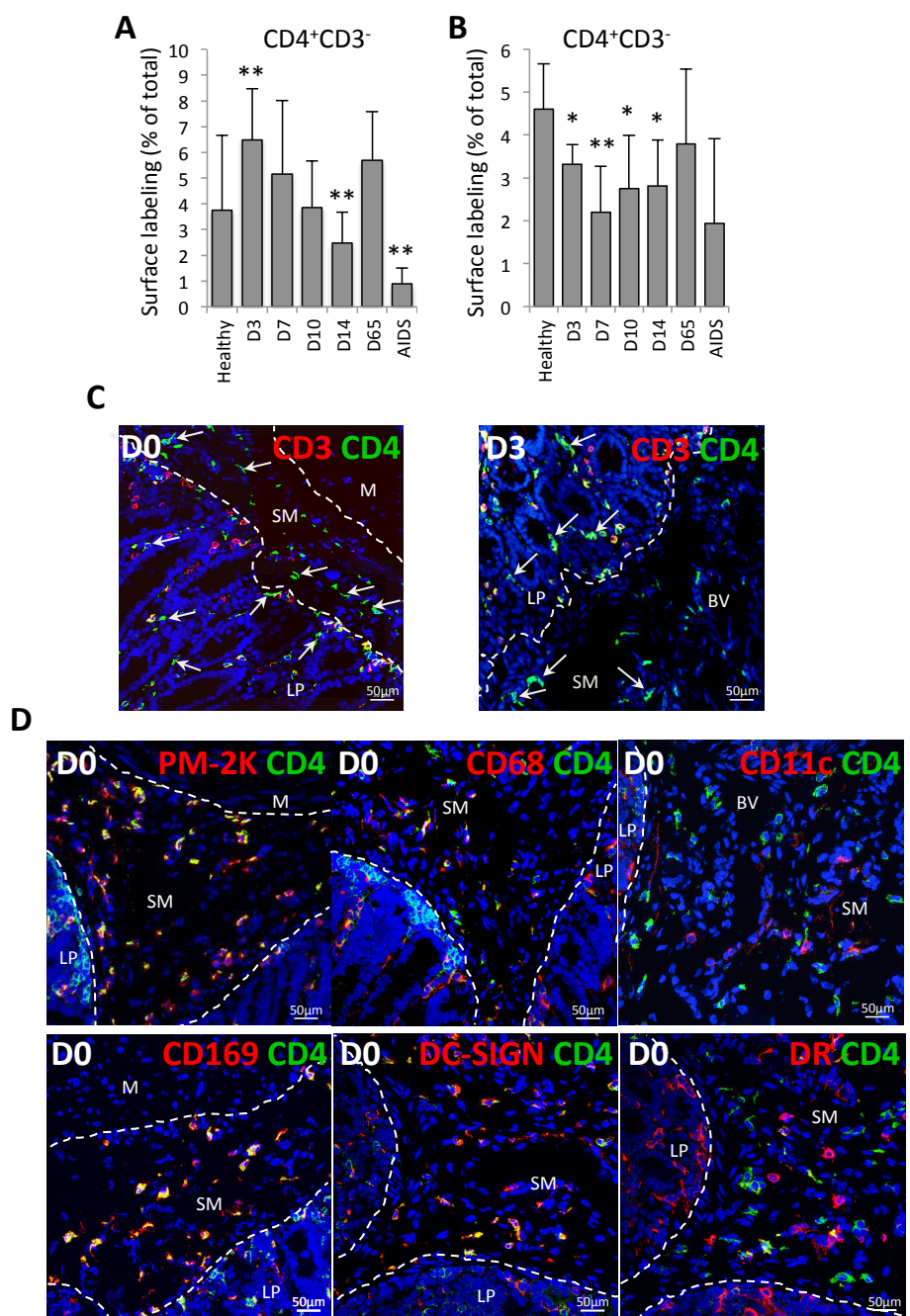


Figure 4

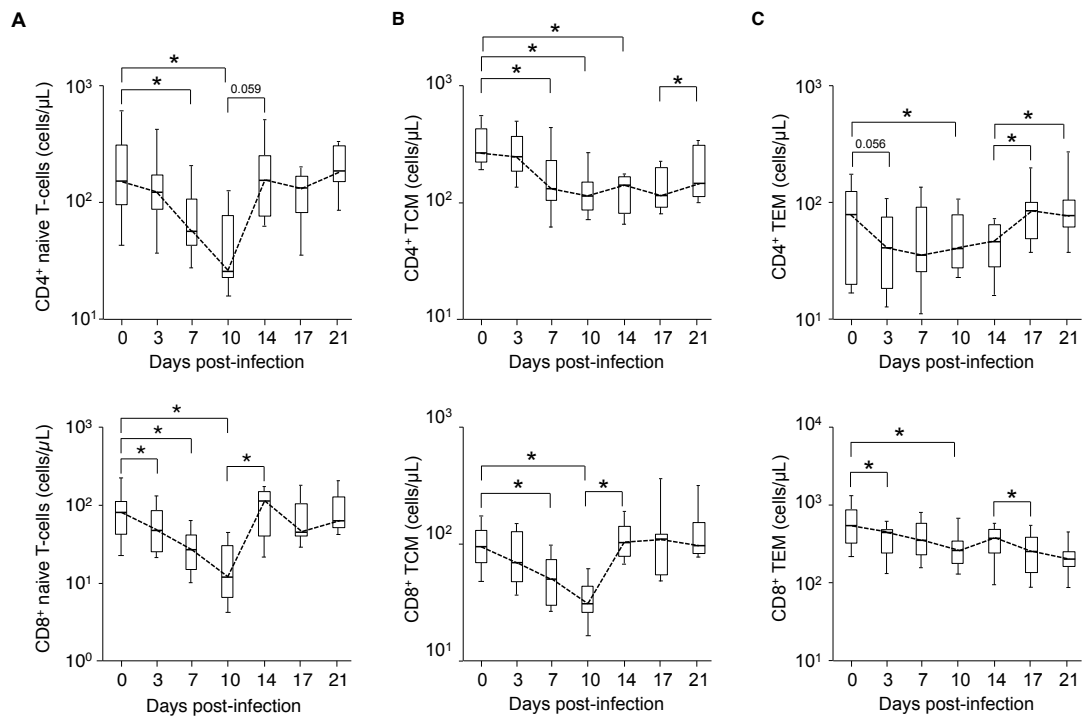


Figure 5

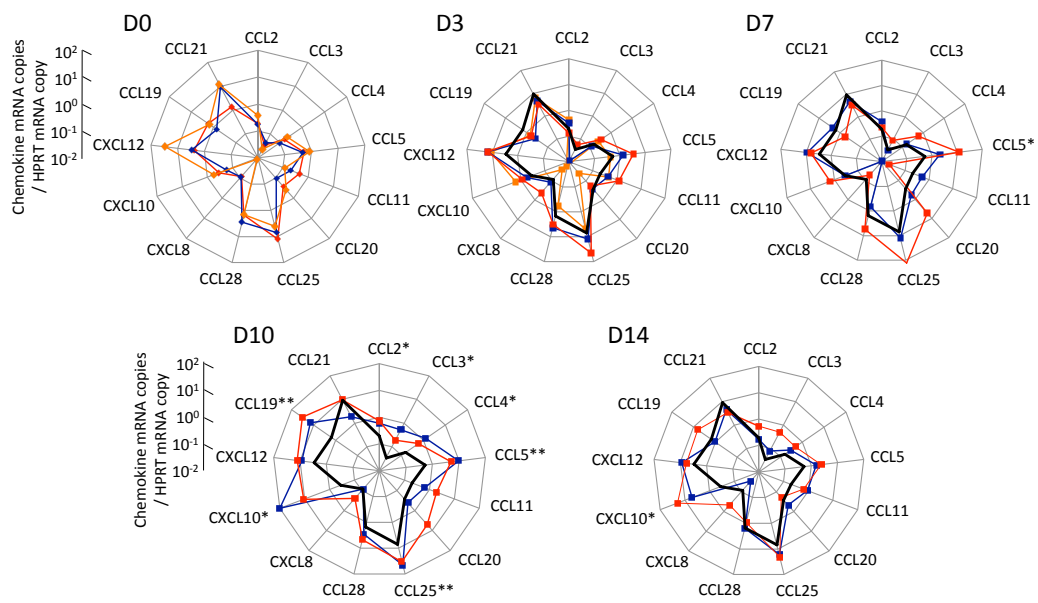


Figure 6

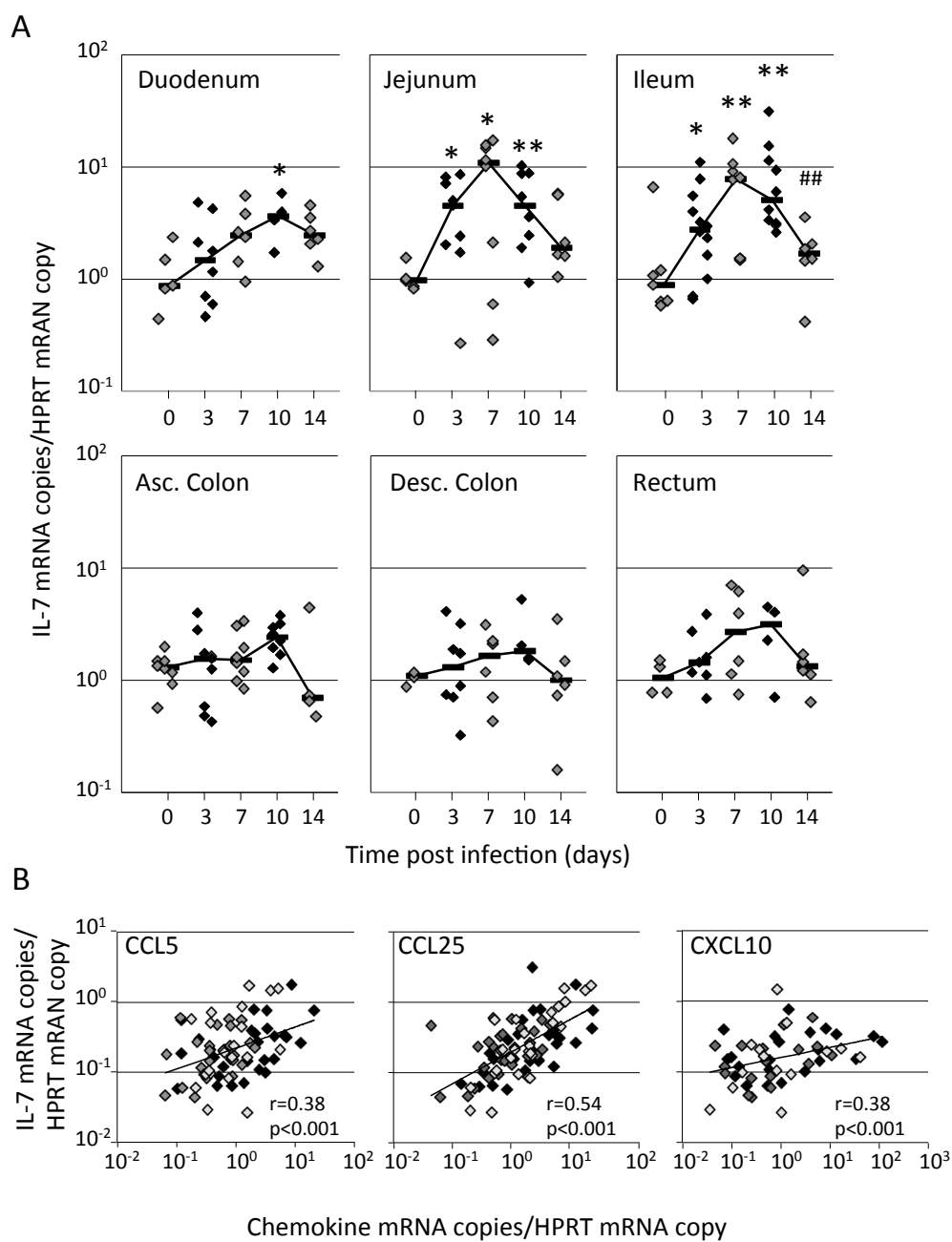
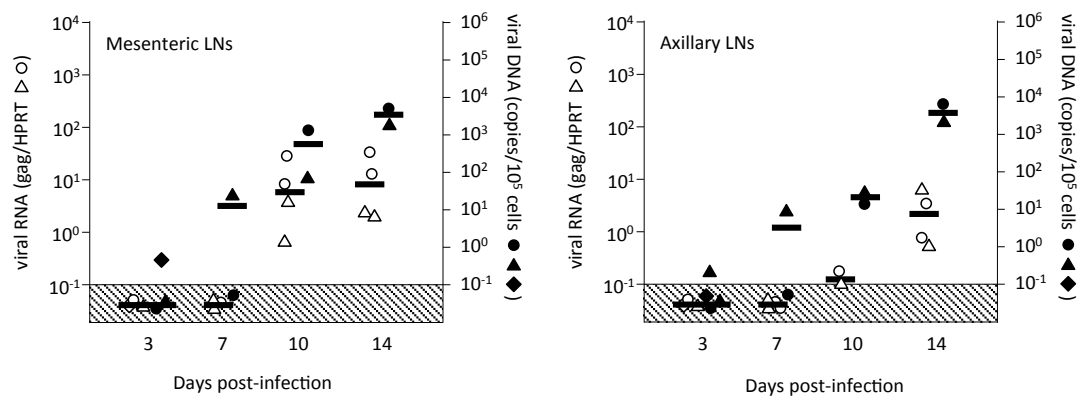
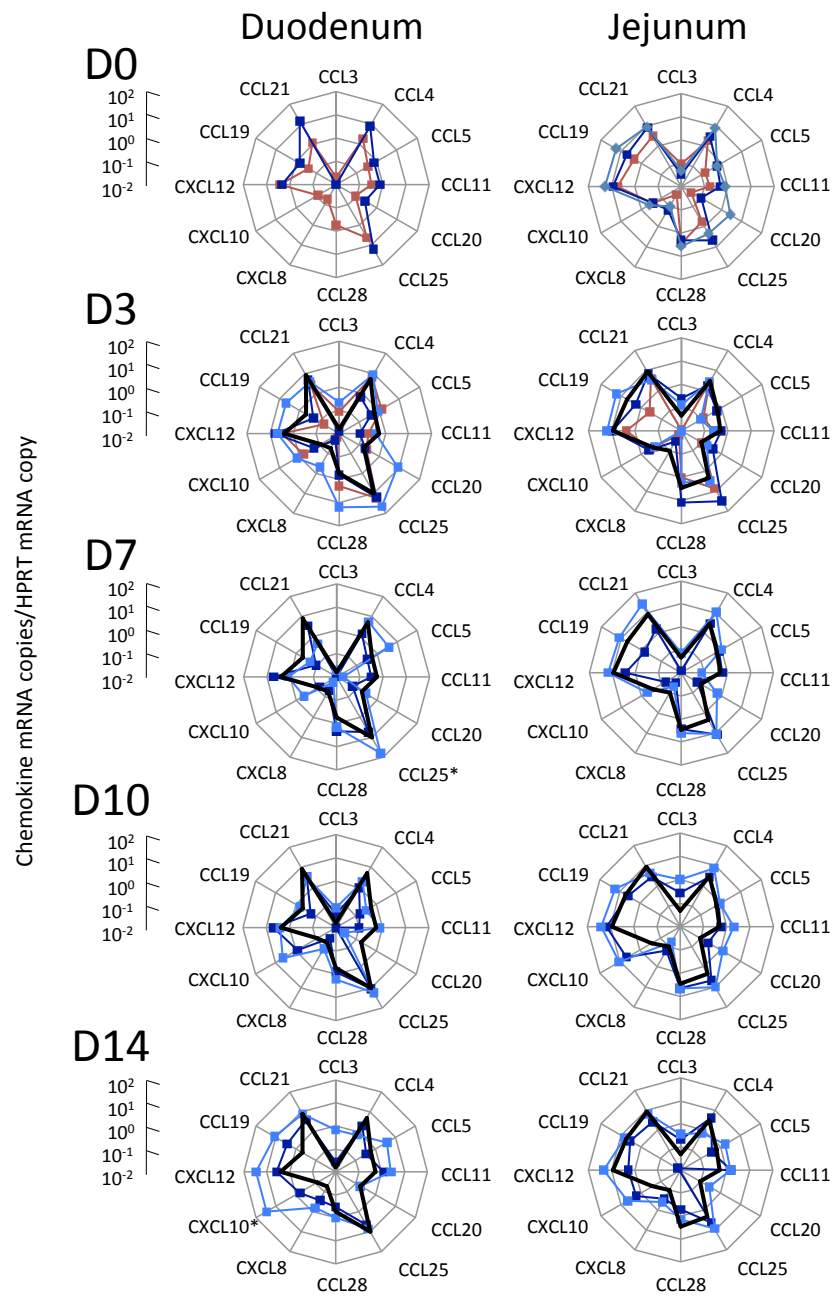


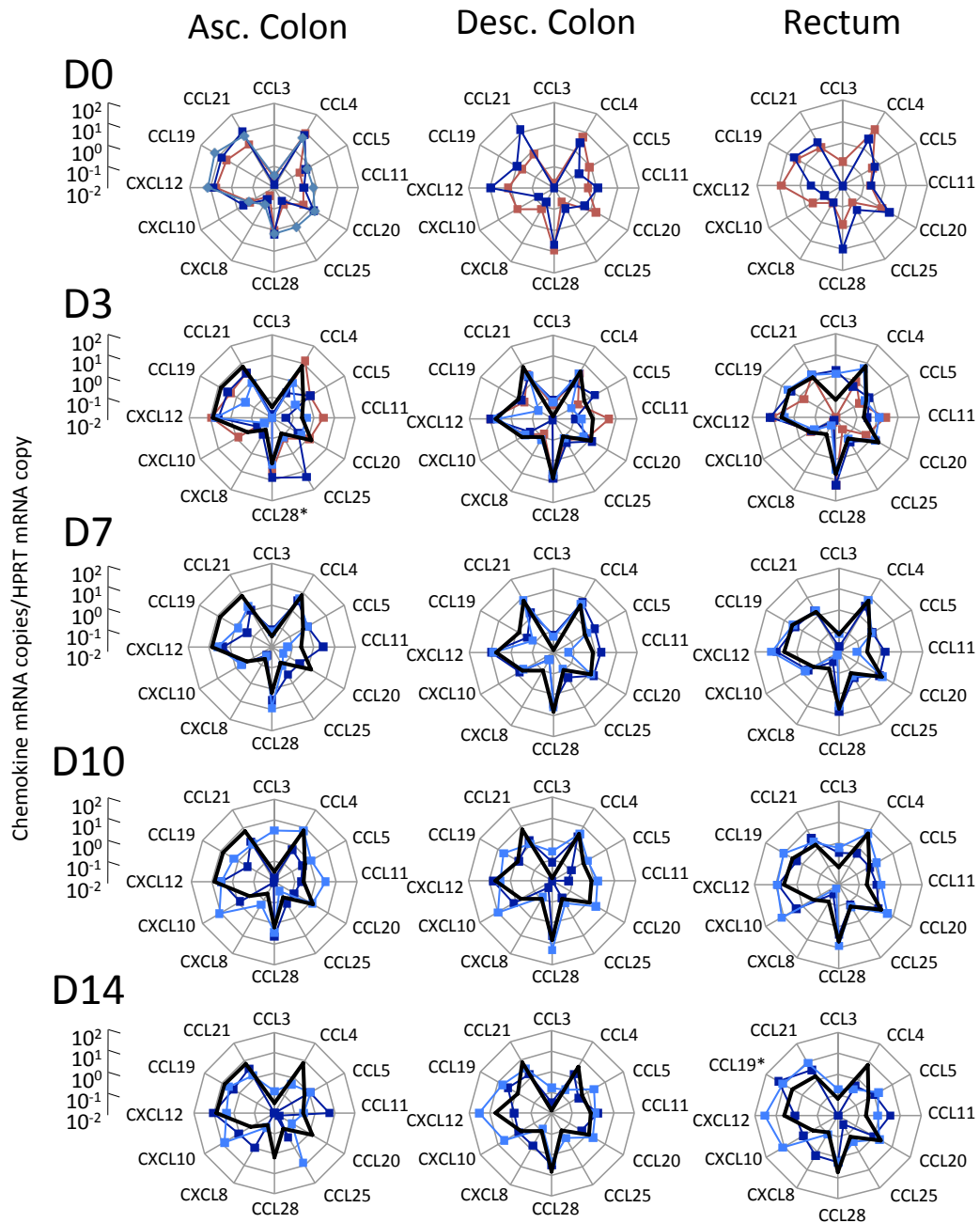
Figure 7



Supplemental figure 1



Supplemental figure 2



Supplemental figure 3

C. Synthèse des résultats

Dans un premier temps, nous évaluons la dissémination et la réplication virale dans le tractus digestif du macaque rhésus chinois. Nous démontrons que l'intestin grêle est plus susceptible à l'infection par le SIV que les autres segments du tractus digestif. En particulier, l'iléon est la cible d'une réplication virale plus précoce et intense. Nous avons donc choisi d'analyser les conséquences de l'infection sur la distribution des lymphocytes T CD4⁺ dans la muqueuse iléale.

Nous avons mis en évidence une répartition hétérogène des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ au sein de la lamina propria iléale chez les animaux sains comme infectés. Afin d'éviter les biais que pourraient constituer le comptage des cellules à partir de champs microscopiques restreints, nous avons mis au point une méthode de quantification automatique des cellules marquées sur champ large. La surface occupée par les cellules T CD4⁺ varie de 3,85 à 20,6% selon les zones de lamina propria analysées. Ces résultats démontrent bien l'importance d'une estimation basée sur l'analyse de grandes surfaces de muqueuses. Nous montrons que le nombre de cellules T cytotoxiques (CD3⁺ CD8⁺) est augmenté significativement à partir du jour 7 jusqu'au jour 14 post-infection. Chez les animaux en phase chronique (J65) et au stade SIDA, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ dans la lamina propria de la muqueuse iléale est toujours significativement plus élevé comparé aux animaux sains.

Nous démontrons que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ de la lamina propria de l'iléon des animaux demeure stable jusqu'à 14 jours après l'infection par le SIV. Au jour 65 post-infection, ce nombre est toujours inchangé alors qu'il est diminué de manière très significative dans la lamina propria du singe sacrifié présentant des symptômes liés au SIDA.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence qu'environ la moitié des cellules CD4⁺ de la lamina propria iléale ne sont pas des lymphocytes T (ne co-expriment pas CD3). Ces cellules sont particulièrement abondantes dans la sous-muqueuse des animaux où elles montrent une morphologie caractéristique des APC (présence de dendrites) et sont identifiées par des marqueurs de macrophages (PM-2K, CD68 et DC-SIGN exprimé également par les cellules dendritiques). Ces macrophages semblent migrer de la sous-muqueuse vers la lamina propria infectée.

En parallèle, l'étude des populations T circulantes au cours des quinze premiers jours après l'infection révèle de profondes modifications des compartiments lymphocytaires T CD4 et CD8. Le suivi longitudinal des différentes sous-populations a montré un déclin du nombre absolu des lymphocytes T naïfs, mémoires centraux et effecteurs mémoires des compartiments CD4 et CD8 les 10 premiers jours après infection. Remarquablement, quatre jours après, le pool lymphocytaire T CD4⁺ et CD8⁺ naïf est reconstitué. De même, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ mémoires, centraux et effecteurs, revient au niveau basal. L'un des processus contribuant aux variations du nombre de cellules T en périphérie implique la migration de ces cellules dans les tissus lymphatiques. C'est pourquoi nous avons quantifié dans la muqueuse iléale l'expression de 12 chimiokines connues pour leur action attractrice sur les lymphocytes T.

Nous montrons tout d'abord que les chimiokines CCL5, CCL25, CCL28, CXCL12 ainsi que CCL19 et CCL21 sont transcrites constitutivement dans la muqueuse iléale chez le macaque rhésus sain. Certaines chimiokines sont à peine détectées chez les animaux sains mais leur transcription est induite après infection. C'est le cas de CCL3, CCL4, CCL11, CCL20 et CXCL10. Enfin, alors que la réplication virale est soutenue dans l'iléon, nos résultats révèlent une augmentation significative mais transitoire de l'expression de nombreuses chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes T. Ces modifications sont concomitantes aux variations du nombre de lymphocytes T en périphérie, suggérant une attraction des cellules périphériques par la muqueuse iléale. L'augmentation de l'expression de CCL2, concomitante à celle de CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10 suggère également une attraction des monocytes/macrophages.

L'expression de l'IL-7, cytokine impliquée précédemment dans le recrutement des lymphocytes T à la muqueuse intestinale, est augmentée dans la muqueuse iléale les tous premiers jours post-infection. La production également transitoire d'IL-7 est corrélée à celle des chimiokines CCL4, CCL5, CCL19 et CCL28.

Dans l'ensemble, nous avons montré que l'infection rapide et intense de la muqueuse iléale induit de profondes modifications de l'expression des chimiokines. L'augmentation transitoire de l'expression des chimiokines est concomitante au déclin du nombre de lymphocytes T dans la circulation sanguine. Ainsi, les cellules T périphériques sont probablement recrutées par la muqueuse iléale au cours de l'infection aiguë par le SIV.

Ce mécanisme est peut-être une des raisons pour laquelle les lymphocytes T CD4⁺ demeurent en nombre constant dans la lamina propria de l'iléon les 14 premiers jours post-infection chez le macaque rhésus chinois. De plus, nos résultats montrent que les macrophages sont abondants dans la sous-muqueuse iléale des singes sains et migreraient vers la lamina propria adjacente après infection par le SIV.

Les résultats non présentés dans l'étude n°1 mais pertinents pour la compréhension et la discussion des résultats sont inclus ci-après dans les résultats supplémentaires.

D. Résultats supplémentaires

1. Suivi longitudinal des animaux infectés

Afin de vérifier que le profil évolutif des animaux infectés était comparable, nous avons suivi la charge virale plasmatique après inoculation du virus (**Figure 21**), ainsi que le taux de lymphocytes T CD4⁺ sanguins (**Figure 22**). Ici, tous les animaux utilisés pour notre étude et présentés dans le chapitre Matériel et Méthodes ont été inclus dans l'analyse longitudinale.

a. Charge virale plasmatique

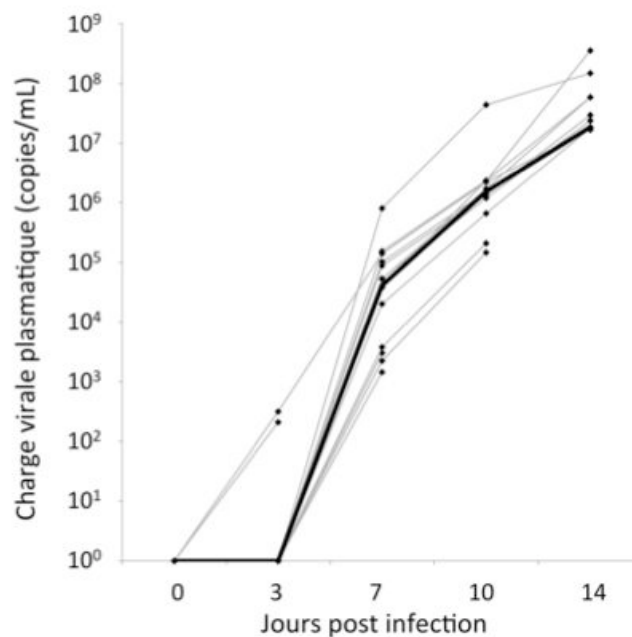


Figure 21 : Charge virale plasmatique au cours de l'infection SIV aiguë.

Quantification par qRT-PCR de la charge virale SIV plasmatique des animaux après infection. Chaque ligne grise représente le suivi d'un animal, la médiane est représentée par la courbe noire.

Nous observons une charge virale plasmatique pour l'ensemble des singes au jour 7 pi (60 copies/ml de plasma en moyenne). Cependant, deux macaques montrent une virémie détectable dès J3. L'un de ces deux animaux a été suivi longitudinalement : il montre une évolution similaire aux autres animaux dès J7pi et ne diffère pas non plus en nombre de lymphocytes T CD4⁺ sanguins.

Le second animal montrant une charge virale détectable à J3 a été sacrifié à ce temps. Il est comparable aux autres singes en terme d'expression de chimiokines et d'IL-7 par la muqueuse iléale. De même, il montre un nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants tout à fait comparable aux autres animaux (516 cellules/ml de sang ; min=303 et max=903, médiane=436,7 cellules/ml de sang pour l'ensemble des animaux). De façon cohérente avec sa virémie élevée, la charge virale ADN dans l'iléon de cet animal est supérieure aux autres animaux sacrifiés à J3pi (à hauteur de 20 copies contre 0,1 et 2 copies d'ADN SIV pour 10⁵ cellules).

Au jour 14, tous les singes ont une charge virale supérieure à 10⁷ copies/mL (1,9.10⁷ copies/ml de plasma en moyenne).

b. Evolution du taux de lymphocytes T CD4⁺ sanguins

Le suivi du nombre de lymphocytes CD3⁺ CD4⁺ circulants des animaux infectés montre une lymphopénie significative dès J3 pi (p=0,0029 et p<0,001 à J7pi et J10pi). Un retour à la normale est observé pour la totalité des animaux à J14pi.

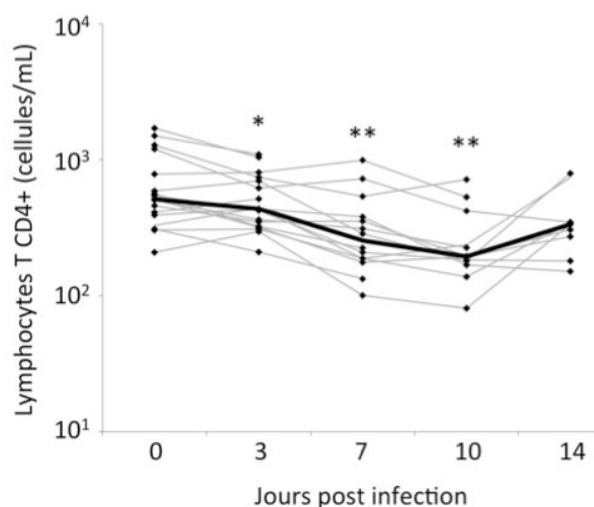


Figure 22 : Nombres de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ circulants au cours de l'infection aiguë. Les fréquences de lymphocytes T CD4⁺ mesurées en cytométrie de flux réalisée sur sang total et les nombres de lymphocytes par ml de sang donnés par les numérations formules sanguines nous permettent de calculer les nombres de cellules T CD4⁺ par ml de sang. Chaque ligne grise représente le suivi d'un animal, la médiane est représentée par la courbe noire.

L'ensemble de ces résultats nous indique que le profil évolutif de la pathologie induite après infection SIV est similaire pour l'ensemble des animaux.

2. Surface occupée par les lymphocytes T CD4⁺ dans l'iléon

a. La surface occupée par le marquage CD3⁺ CD4⁺ dans l'iléon est homogène entre les animaux

La quantification de la surface occupée par le marquage CD3⁺ CD4⁺ dans les différentes zones de lamina propria nous a permis de démontrer la préservation du nombre de ces lymphocytes les deux premières semaines après infection. Ces données sont représentées dans l'étude n°1 en surface totale marquée par surface totale de lamina propria analysée, les singes ayant été groupés en fonction du temps post-infection. L'analyse de ces données par animal ne révèle pas non plus de différence significative du marquage CD3⁺ CD4⁺ (**Figure 23**).

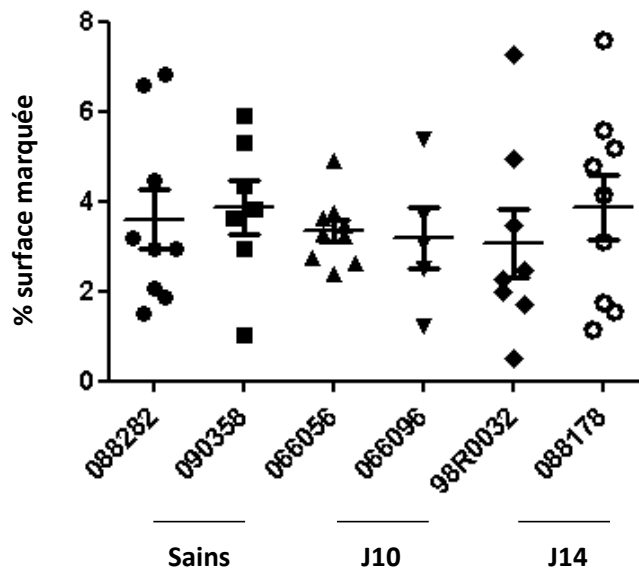


Figure 23 : Surface occupée par le comarquage CD3⁺ CD4⁺ dans la lamina propria par animal.
A J0 (088282 et 090358), J10 (066056 et 066096) et J14pi (98R0032 et 088178).

b. Validation de notre méthode d'estimation du nombre de cellules par unité de surface dans la lamina propria

Notre méthode d'analyse repose sur l'exécution d'une macro qui nous permet de détourner plusieurs zones de lamina propria pour y quantifier le marquage dans les différents filtres de couleur. Préalablement, les cellules épithéliales sont exclues de l'analyse (voir le chapitre matériel et méthodes, partie V) dans le but de ne considérer que la surface et le marquage dans la lamina propria. Afin de pouvoir estimer un nombre de cellules marquées par unité de surface, il convient de connaître la surface moyenne d'un type cellulaire donné dans la lamina propria.

Nous avons donc mesuré manuellement la surface d'une centaine de lymphocytes T CD4⁺ de la lamina propria des animaux sains et à J14pi à l'aide du logiciel Image J. A la résolution utilisée, la surface moyenne d'un lymphocyte T ne varie pas au cours du temps pi. Enfin, nous avons comparé les résultats obtenus par comptage manuel à l'estimation automatique donnée par la macro (**Figure 24**). Pour cela, 20 zones de lamina propria ont été détournées, 10 zones sur une photo prise chez un animal sain et 10 autres chez un animal à J10pi. Les résultats obtenus par quantification automatique et par comptage manuel des lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ doublement marqués montrent une excellente corrélation ($r = 0,98$). Ainsi, les résultats exprimés en pourcentage de surface occupée par un marquage donné permettent également d'estimer le nombre de cellules contenues par unité de surface de lamina propria (**Figure 24**).

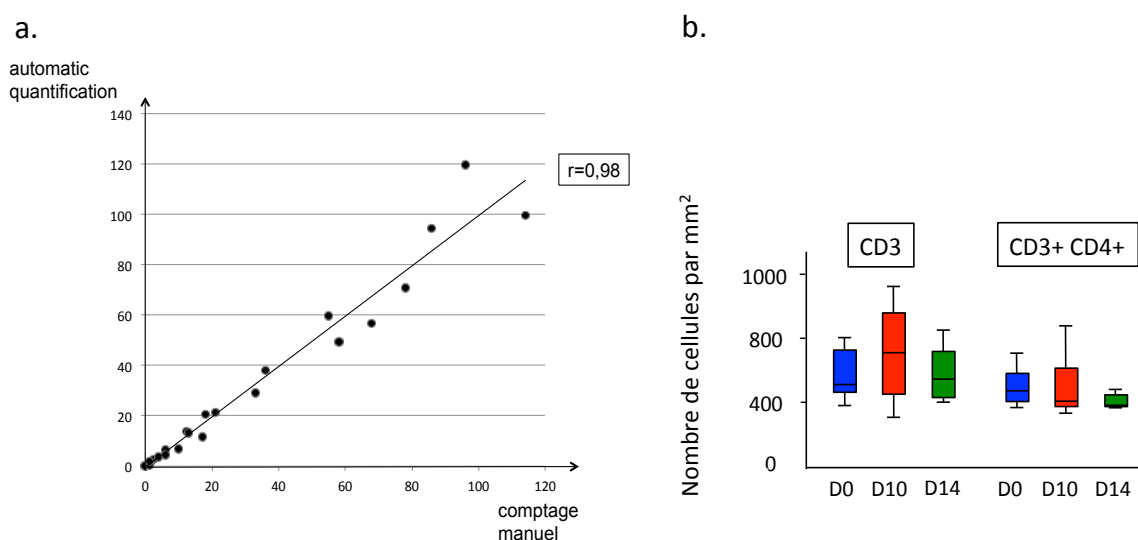


Figure 24 : Estimation du nombre de cellules marquées

- a. Corrélation entre la méthode de comptage automatique et le comptage manuel des lymphocytes doublement marqués CD3⁺ CD4⁺. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules.
- b. estimation du nombre de lymphocytes T CD3⁺ et T CD4⁺ par unité de surface de lamina propria chez les animaux sains (D0), à J10pi (D10) et J14pi (D14).

L'étude n°1 révèle une réplique du SIV plus intense et plus précoce dans la muqueuse de l'intestin grêle après comparaison du taux d'infection dans les différents segments du tractus digestif au cours du temps post-infection. Nous avons montré que les ganglions drainant la muqueuse intestinale et les ganglions périphériques sont aussi rapidement infectés.

Nous avons ensuite recherché les conséquences de l'infection aiguë des ganglions mésentériques et axillaires sur la production locale de chimiokines.

3. L'expression des chimiokines dans les ganglions est modifiée après infection

a. Expression des chimiokines dans les ganglions des singes sains

Afin de déterminer l'impact de l'infection sur l'expression des chimiokines dans les ganglions, nous avons tout d'abord mesuré leur expression dans les organes des animaux sains. Comme dans l'étude n°1, douze chimiokines ont été quantifiées par RT-qPCR (**Figure 25**) à partir d'au moins deux morceaux de ganglions par animal sain (n=3).

Pour des raisons visuelles de représentation, l'échelle de la figure ci-dessous a été ajustée pour figurer des valeurs de 10^{-3} copies d'ARN cible / copie d'ARN HPRT. Ici, par souci de synthèse, je ne mentionnerai pas les chimiokines dont la quantité d'ARNm est en deçà de 10^{-1} copies d'ARNm (c'est à dire 10 fois moins exprimée qu'HPRT).

Dans les ganglions axillaires, la quantification de l'ARNm codant chaque chimiokine chez les animaux sains montre une expression élevée des chimiokines CXCL12 (valeur médiane 17,82 copies d'ARN/copie d'ARNm HPRT), CCL19 et CCL21 (13,36 et 45,47 copies respectivement par copie d'ARNm HPRT). Plus faiblement, les chimiokines CCL4, CCL5, CCL20 et CXCL10 semblent transcrites constitutivement dans les ganglions axillaires des singes sains. L'ARNm codant pour ces protéines est retrouvé en quantités proches du nombre de copies d'ARNm codant pour HPRT (valeurs médianes proches de 1).

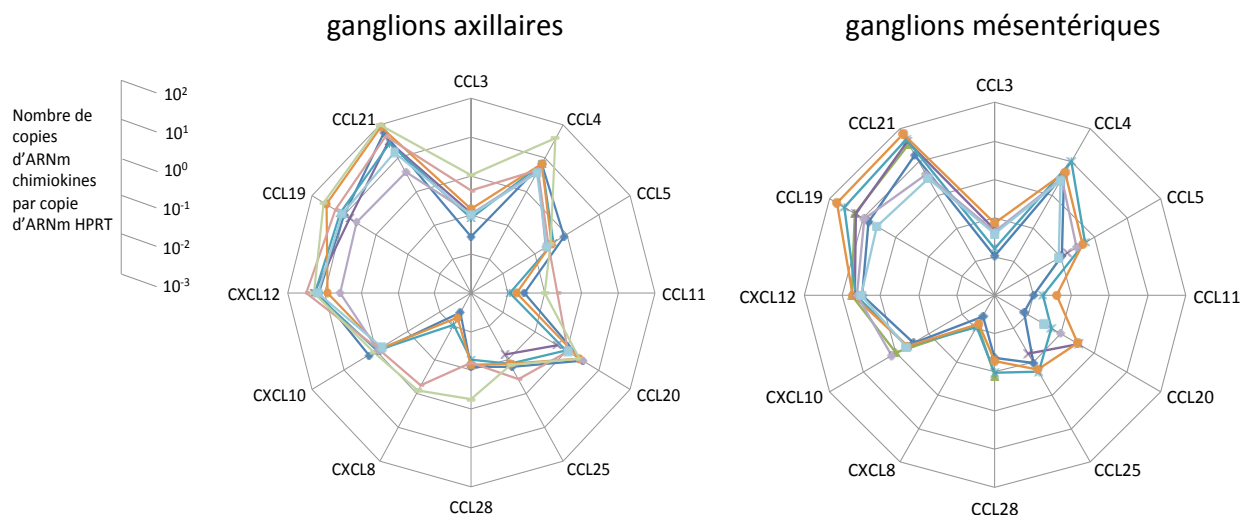


Figure 25 : Expression des chimiokines dans les ganglions de macaques rhésus sains.

Quantification par RT-qPCR de 12 chimiokines chez trois macaques rhésus sains (au moins deux morceaux par singe). Chaque axe représente l'expression d'une chimiokine et la position de chaque point sur les axes représente le nombre de copies d'ARNm codant chaque chimiokine pour une copie d'ARNm HPRT. Une couleur est associée à un morceau de ganglion.

Dans les ganglions mésentériques des animaux sains, les chimiokines CCL19 et CCL21 sont le plus fortement exprimées (17,84 et 36,98 copies par copie d'ARNm HPRT respectivement). CXCL12 est également transcrite dans les ganglions non infectés à hauteur de la transcription du gène HPRT (valeur médiane à 4,33 copies d'ARNm/copie d'ARNm HPRT), de même que CCL4 (4,21 copies /copie d'HPRT). Les chimiokines CCL5 et CXCL10 sont transcrites constitutivement à faible niveau dans les ganglions mésentériques des singes sains.

b. Modification de l'expression des chimiokines dans les ganglions au cours de l'infection aiguë par le SIV

Pour évaluer l'impact de l'infection aiguë des ganglions sur la production de chimiokines et après avoir évalué la quantité d'ARNm codant pour chaque chimiokine à l'état basal, nous avons mesuré l'évolution de leur expression après infection des animaux par le SIV.

i) Induction de l'expression de CXCL10 et CCL5 dans les ganglions axillaires

Dans les ganglions axillaires, seules les quantités d'ARNm codant pour les chimiokines CXCL10 et CCL5 sont modifiées significativement au cours de l'infection par le SIV (**Figure 26**). A J10pi, l'infection des ganglions axillaires provoque une augmentation conséquente de l'expression de CXCL10 ($p=0,0003$) qui reste supérieure à celle des animaux sains à J14 ($p=0,006$). L'expression de CCL5 augmente progressivement pendant les deux premières semaines de l'infection mais n'est augmentée significativement qu'à J14pi ($p=0,002$).

Notons que pour toutes les autres chimiokines testées, y compris CCL19 et CCL21 dont les transcrits sont majoritaires dans le ganglion sain, les quantités d'ARNm ne diffèrent pas significativement au cours de la phase aiguë de l'infection par le SIV par rapport aux animaux contrôles non infectés (résultats non montrés).

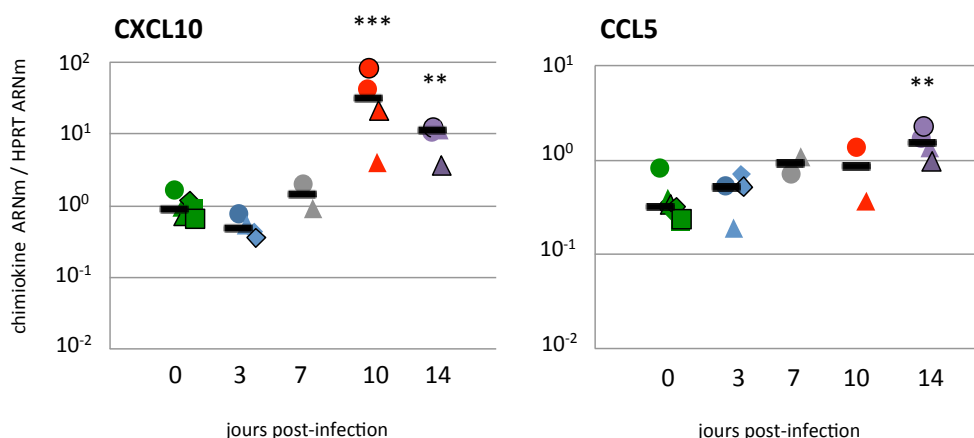


Figure 26 : Quantification de l'ARNm codant pour CXCL10 et CCL5 dans les ganglions axillaires au cours de la phase aiguë de l'infection SIV.

Quantification par RT-qPCR de la concentration en ARNm exprimée par copie d'ARNm codant pour HPRT. Chaque couleur est attribuée à un temps post-infection et chaque symbole à un animal. La médiane est représentée par une barre horizontale noire. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ selon le test U de Mann-Whitney, en comparaison avec les animaux sains.

Notons qu'à l'inverse de CCL5 dont l'expression semble augmenter graduellement au cours de l'infection aiguë, les quantités d'ARNm codant pour CXCL10 montrent une tendance à la diminution à J14pi par rapport à J10pi.

ii) Induction de l'expression de CCL5, CCL20 et CXCL10 dans les ganglions mésentériques

Dans les ganglions mésentériques comme dans les ganglions axillaires, l'expression de CXCL10 augmente significativement dès J10pi et reste supérieure à celle du groupe contrôle à J14pi ($p = 0,0012$ et $p = 0,0095$ respectivement). L'expression de CCL5 est augmentée au jour 14 après infection par le SIV par rapport aux singes contrôles ($p = 0,0095$).

Alors que les transcrits codants pour CCL20 ne sont que faiblement détectables chez les animaux sains, leur quantité augmente au jour 14 après infection par le virus ($p = 0,03$). Notons la grande variabilité de quantité d'ARNm codant CCL20 au sein d'un même singe (même symbole) et entre ces animaux à chaque temps post-infection (**Figure 27**).

La concentration d'ARNm codant pour toutes les autres chimiokines testées, y compris CCL19 et CCL21, reste inchangée dans les ganglions mésentériques les 14 premiers jours après infection des animaux par le SIVmac.

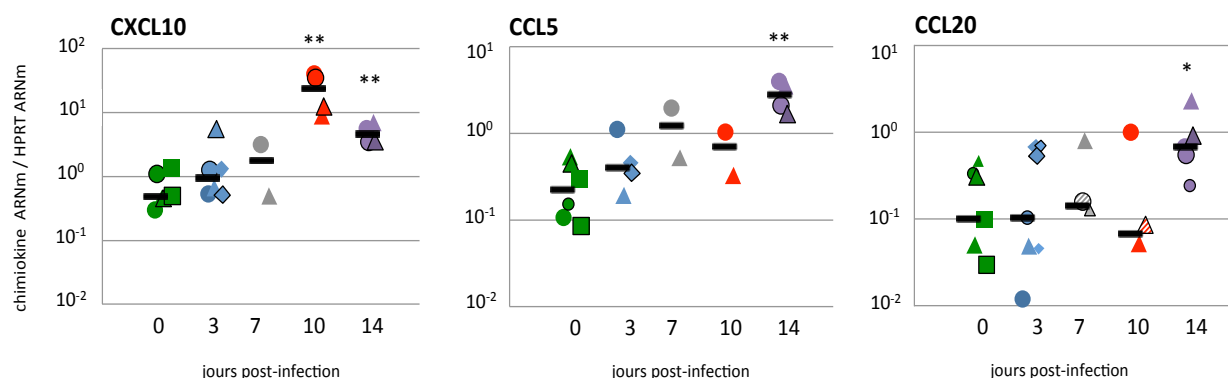


Figure 27 : Quantification de l'ARNm codant CXCL10, CCL5 et CCL20

Quantification par RT-qPCR de la concentration en ARNm exprimée par copie d'ARNm codant pour HPRT. Chaque couleur est attribuée à un temps post-infection et chaque symbole à un animal. La médiane est représentée par une barre horizontale noire. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ selon le test U de Mann-Whitney, en comparaison avec les animaux sains.

c. La quantité d'ARNm codant pour l'IL-7 dans les ganglions lymphatiques n'est pas modifiée pendant la phase aiguë de l'infection

D'après nos résultats de l'étude n°1, l'expression de l'IL-7 est augmentée transitoirement dans l'intestin grêle des animaux dès J3pi pour revenir à un niveau basal dès J14pi. Par ailleurs, ces modifications d'expression de l'IL-7 corrélaient avec l'expression des chimiokines CCL4, CCL5, CCL28 et CCL19.

Afin d'évaluer le caractère spécifique de ces modifications dans la muqueuse iléale, nous avons quantifié l'expression de l'IL-7 dans les ganglions lymphatiques. Dans les ganglions, la quantité d'ARNm codant pour cette cytokine reste stable au cours de l'infection aiguë par le SIV (résultats non montrés).

Chez les animaux sains, la quantité d'ARNm codant l'IL-7 est plus élevée dans les ganglions axillaires en comparaison avec la quantité d'ARNm détectée dans la muqueuse iléale ($p = 0,0041$), **Figure 28**. Elle est également supérieure à celle des ganglions mésentériques drainant la muqueuse intestinale ($p = 0,0134$). La quantité de transcrits IL-7 détectés demeure inférieure à celle des transcrits codant pour HPRT. Notons que ces résultats sont en accord avec les données de la littérature à propos de la faible expression de cette cytokine, rendant difficile sa détection par les méthodes *in situ* classiques, au niveau ARNm comme au niveau protéique (Mazzucchelli et al., 2009).

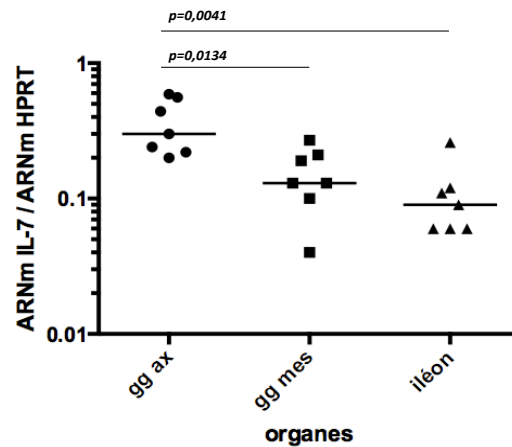


Figure 28 : Quantification de l'expression de l'IL-7 dans les ganglions axillaires, mésentériques et l'iléon des animaux sains

Quantification par RT-qPCR de la concentration en ARNm exprimée par copie d'ARNm codant pour HPRT dans au moins deux morceaux d'organe par singe.

La médiane est représentée par une barre horizontale noire. Test statistique de Mann-Whitney.

gg ax : ganglions axillaires, gg mes : ganglions mésentériques

Malgré une réplication virale détectable dès J10pi dans les ganglions, les quantités de transcrits codant l'IL-7 et la plupart des chimiokines testées ne sont pas modifiées au cours de l'infection aiguë par le SIV. Ces résultats suggèrent que (i) les modifications d'expression de l'IL-7 induite par le virus sont spécifiques à la muqueuse intestinale et que (ii) l'augmentation de la transcription des chimiokines CXCL10, CCL5 dans les ganglions axillaires et de ces mêmes protéines additionnées de CCL20 dans les ganglions mésentériques ne sont pas induites par des modifications d'expression de l'IL-7 dans ces organes.

L'expression de nombreuses chimiokines est également augmentée spécifiquement et transitoirement dans la muqueuse iléale comparée au colon (étude n°1 et résultats non montrés). Ces résultats indiquent que l'infection des PNH par le SIVmac induit des modifications importantes du profil d'expression de l'IL-7 et des chimiokines spécifiquement dans l'intestin grêle des animaux, plus large segment du tractus intestinal et cible privilégiée de la réplication virale les premiers jours après infection.

Les modifications profondes de l'expression des chimiokines par la muqueuse iléale sont concomitantes aux fluctuations du nombre de lymphocytes T observées dans le sang. Ainsi, l'augmentation de la production de chimiokines jusqu'au jour 10pi est probablement à la base d'un recrutement massif de lymphocytes T périphériques, naïfs et mémoires, quittant la circulation sanguine pour rejoindre le tissu infecté.

De façon intrigante, au jour 14pi, alors que les chimiokines voient leur expression diminuée dans la muqueuse iléale, le nombre des lymphocytes T des compartiments CD4 et CD8 naïfs atteint à nouveau son niveau de base. Afin de mieux comprendre ce rebond des cellules naïves en périphérie, j'ai participé à explorer l'impact de l'infection SIV sur la fonction thymique des macaques rhésus au cours de l'infection aiguë par le SIV (publication n°2).

III. Etude n°2.

Introduction intermédiaire et synthèse des résultats

A. Introduction à la fonction thymique

1. Anatomie et histologie du thymus

Le thymus est un organe polylobé situé sous la thyroïde et en arrière du sternum. Le thymus est très actif durant la vie fœtale et l'enfance puis involue à partir de la puberté. Chaque lobe est délimité par des trabécules et se divise en (i) une partie externe, le cortex, comprenant les cellules épithéliales thymiques (cTEC pour « cortical Thymic Epithelial Cells ») au contact des thymocytes immatures et (ii) une partie interne, la médulla, qui comprend les cellules épithéliales médullaires, des thymocytes matures, des macrophages et des cellules dendritiques.

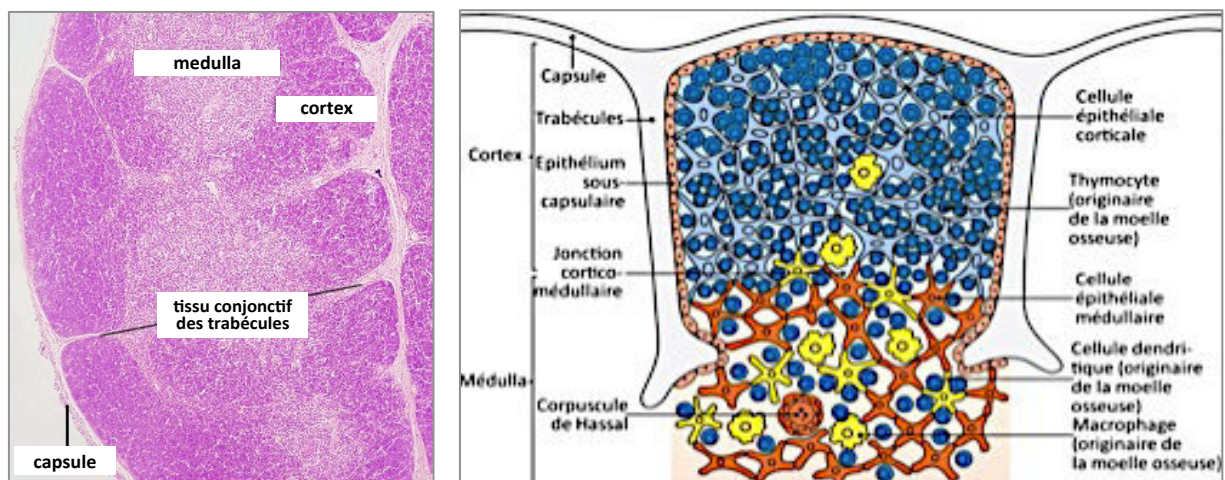


Figure 29 : Histologie et organisation du thymus humain.

D'après Janeway et al, 2003.

2. Principales étapes de la thymopoïèse humaine et implication des chimiokines

La maturation des thymocytes dans le thymus est un phénomène mettant en jeu à la fois le réarrangement du TCR et la capacité de celui-ci à reconnaître un peptide associé au CMH tout en évitant la réactivité contre le soi. Cette maturation est effectuée de manière concomitante à la migration des thymocytes entre différents compartiments thymiques. Ces migrations sont sous le contrôle de chimiokines (**Figure 30**).

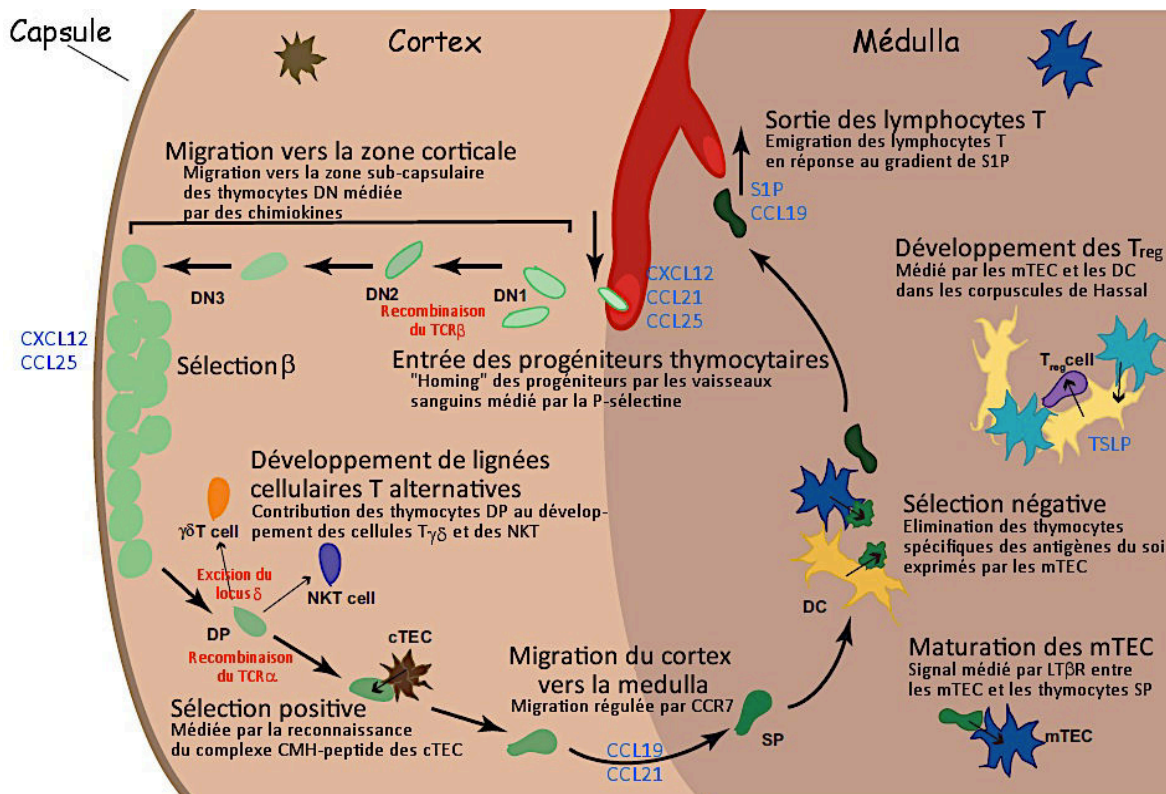


Figure 30 : Les différentes étapes de la thymopoïèse humaine
(d'après (Ladi, Yin, Chtanova, & Robey, 2006))

L'entrée des progéniteurs thymocytaires CD34⁺ se fait par des veinules situées à la jonction cortico-médullaire des lobules (Lind, Prockop, Porritt, & Petrie, 2001). Cette entrée est dépendante de l'expression de la P-sélectine par les endothéliums thymiques qui s'associe à son ligand (PSGL-1 pour "P-Selectin Glycoprotein Ligand-1") exprimé par les progéniteurs CD34⁺. D'autres molécules d'adhésion sont essentielles à l'entrée des progéniteurs T, comme notamment l'intégrine α6 retrouvée également en surface des endothéliums thymiques (Ruiz, Wiles, & Imhof, 1995). Une fois entrés dans le thymus, les précurseurs sont appelés doubles négatifs (DN). Leur phénotype est principalement défini par l'expression de la molécule CD34 et l'absence des molécules CD4 et CD8 (Blom et al., 1999).

C'est au cours de leur migration dans le cortex que la maturation des DN s'effectue. Cette maturation corticale est actuellement mieux comprise chez la souris que chez l'homme. Ainsi, les cellules murines DN1 ($CD3^-CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$) passent au stade DN2 ($CD3^-CD4^-CD8^-CD44^+CD25^+$) et enfin au stade DN3 ($CD3^-CD4^-CD8^-CD44^-CD25^+$) (Lind et al., 2001). Cette migration implique la chimiokine CXCL12 qui est produite au niveau des corpuscules de Hassal et dans la zone sous capsulaire (Zaitseva et al., 1998). En effet, les thymocytes expriment CXCR4 du stade DN2 au stade DP (Ara et al., 2003).

C'est au stade DN que la chaîne β du TCR est réarrangée grâce aux protéines RAG-1 et RAG-2. Seules les cellules exprimant une chaîne β capable de s'associer à la protéine membranaire pré-TCR α (pT α) seront capables de survivre et de proliférer. Après cette sélection, les thymocytes entrent dans une phase de prolifération intense dans la zone sous capsulaire (Falk, Biro, Kohler, & Eichmann, 1996), (Tourigny, Mazel, Burtrum, & Petrie, 1997) et deviennent des cellules simples positives immatures (ISP pour « Immature Simple Positive », $CD3^+CD4^+CD8^-$).

Les thymocytes expriment CXCR4 du stade ISP au stade DP (Ara et al., 2003). L'expression de CXCL12 semble ainsi être importante pour la prolifération de ces progéniteurs dans la zone sous capsulaire.

Cette prolifération a pour conséquence d'augmenter le nombre de cellules qui atteindront le stade double positif (DP; $CD3^+CD4^+CD8^+$). Le passage de la sélection β induit ensuite une nouvelle vague d'expression des protéines RAG-1 et RAG-2 permettant l'excision du locus TCRD puis le réarrangement de la chaîne α du TCR.

Les thymocytes DP ayant réarrangé une chaîne α spécifique (V α 14-J α 18) peuvent reconnaître une molécule du CMH de classe I non classique, le CD1d, orientant leur différenciation en NKT (Kronenberg, 2005). D'autres thymocytes DP vont, via la signalisation par le récepteur de la lymphotoxine β (LT β R), s'orienter vers une différenciation $\gamma\delta$ (Silva-Santos, Pennington, & Hayday, 2005). Une fois les chaînes α et β du TCR réarrangées, les thymocytes DP sont sélectionnés selon la fonctionnalité de leur TCR et finissent leur maturation pour se différencier en thymocytes simple positifs SP4 ou SP8 (Singer, 2002).

Les thymocytes SP ayant passé la sélection positive arrêtent d'exprimer CXCR4 (Suzuki et al., 1998) au profit de CCR7 et CCR4 (Ueno et al., 2004), migrent ensuite vers la médulla thymique où les ligands de ces récepteurs (CCL19 et CCL22) sont exprimés. Dans la médulla, ils subissent la sélection négative, processus dirigé par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC). La sortie des thymocytes matures s'effectue grâce à la chimiokine CCL19 sécrétée par les cellules endothéliales thymiques mais également grâce au gradient de Sphingosine 1-Phosphate (S1P) (Cyster, 2005). Les lymphocytes T matures nouvellement exportés en périphérie sont alors appelés émigrants thymiques récents (RTE pour "Recent Thymic Emigrants").

B. Les TRECs (« T-cell receptor excision circles »)

Pendant le processus de différenciation des thymocytes, les chaînes α et β du TCR subissent différents réarrangements, processus stochastique au cours duquel les segments non contigus V (variable), D (diversité, uniquement pour la chaîne β) et J (jonction) s'associent pour former des séquences TCR complètes et surtout variées (Malissen et al., 1992), (Schatz, 2004). Les deux événements de recombinaison $D\beta-J\beta$ et $V\beta-Dj\beta$ sont médiés par RAG-1 et RAG-2 et conduisent à la circularisation de l'ADN excisé du génome. Les cercles d'excision d'ADN ainsi formés, appelés TREC ($DJ\beta$ TREC et $VD\beta$ TREC), ne possèdent pas d'origine de réplication et donc ne se dupliquent pas lors des divisions cellulaires et ne sont pas dégradés par la cellule. Ainsi, ces molécules sont diluées au sein de la population cellulaire au cours des cycles mitotiques et peuvent, par leur quantification, informer sur le nombre de cycles prolifératifs que ces cellules ont subi depuis le réarrangement dont ils sont issus.

C. Etude n°2

Modified interferon- α subtypes production and chemokine networks in the thymus during acute simian immunodeficiency virus infection, impact on thymopoiesis

Jacques Dutrieux^{a,b,c,d,*}, Véronique Fabre-Mersseman^{a,b,c,*},
Bénédicte Charmeteau-De Muylder^{a,b,c}, Magali Rancez^{a,b,c},
Rosalie Ponte^{a,b,c}, Sandra Rozlan^{a,b,c}, Suzanne Figueiredo-Morgado^{a,b,c},
Amandine Bernard^{a,b,c}, Stéphanie Beq^{a,b,c},
Anne Couëdel-Courteille^{a,b,c,d} and Rémi Cheynier^{a,b,c}

Objectives: Thymus dysfunction characterizes human/simian immunodeficiency virus (SIV) infections and contributes to physiopathology. However, both the mechanisms involved in thymic dysfunction and its precise timing remain unknown. We here analyzed thymic function during acute SIV infection in rhesus macaques.

Design and methods: Rhesus macaques were intravenously infected with SIVmac₂₅₁ and bled every 2/3 days or necropsied at different early time points postinfection. Naïve T-cell counts were followed by flow cytometry and their T-cell receptor excision circle content evaluated by qPCR. Thymic chemokines were quantified by reverse transcription-qPCR and localized by in-situ hybridization in thymuses collected at necropsy. Thymic interferon alpha (IFN- α) subtype production was quantified by reverse transcription-qPCR combined to heteroduplex tracking assay. The effect of thymic IFN- α subtypes was tested on sorted triple negative thymocytes cultured on OP9-hDL1 cells.

Results: A reduced intrathymic proliferation history characterizes T cells produced during the first weeks of infection. Moreover, we evidenced a profound alteration of both chemokines and IFN- α subtypes transcriptional patterns in SIV-infected thymuses. Finally, we showed that IFN- α subtypes produced in the infected thymuses inhibit thymocyte proliferation, still preserving their differentiation capacity.

Conclusion: Thymopoiesis is deeply impacted from the first days of SIV infection. Reduced thymocyte proliferation – a time-consuming process – together with modified chemokine networks is consistent with thymocyte differentiation speed-up. This may transiently enhance thymic output, thus increasing naïve T-cell counts and diversity and the immune competence of the host. Nonetheless, long-lasting modification of thymic physiology may lead to thymic exhaustion, as observed in late primary HIV infection.

© 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2014, **28**:1101–1113

Keywords: acute viral infection, chemokines, HIV, interferon- α subtypes, physiopathology, simian immunodeficiency virus, sj/bTREC ratio, TREC, thymopoiesis, thymus

^aINSERM, U1016, Institut Cochin, ^bCNRS, UMR8104, ^cUniversité Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, and ^dUniversité Paris Diderot, Paris, France.

Correspondence to Rémi Cheynier, Département Immunité Infection Inflammation, Institut Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France.

Tel: +33 1 40 51 65 41; fax: +33 1 40 51 65 10; e-mail: remi.cheynier@inserm.fr

* Jacques Dutrieux and Véronique Fabre-Mersseman contributed equally to the writing of the article.

Received: 21 October 2013; revised: 4 February 2014; accepted: 4 February 2014.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000249

Introduction

T-cell maturation in the thymus allows maintaining a broadly diversified population of naive T cells in the periphery that permits the immune system to react against most invading pathogens. Part of this diversity originates from proliferation that occurs between T-cell receptor beta (*TCRB*) and T-cell receptor alpha (*TCRA*) rearrangements at both the intermediate single-positive (ISP) and double-positive differentiation steps [1]. During primary HIV infection, premature thymus aging, characterized by reduced intrathymic precursor T-cell proliferation and thymic export, participates in naive T-cell exhaustion and immunodeficiency [2–4]. This could be a consequence of either the cytokine storm accompanying viral replication or infection of the thymus itself, or both. Indeed, the thymus is infected in patients with acquired immune deficiency syndrome [5], in HIV-infected severe combined immunodeficiency-hu mice [6,7], and in acutely simian immunodeficiency virus (SIV)-infected newborn macaques [8]. Moreover, the cytokine storm triggered by HIV/SIV infection contributes to the initial control of viral replication, but also contributes to the immunopathology of the infection [9]. Among the cytokines whose production is strongly enhanced during acute infection, interferon alpha (IFN- α) was suggested as contributing to HIV-induced thymic dysfunction [2,10]. Indeed, apart from its antiviral effect principally triggered by stimulation of PKR, 2'5'OAS, or Mx proteins, IFN- α also limits viral replication by inhibition of cell cycling through stimulation of p21 and p27 (Kip1) expression, thus limiting cyclin-D2 and cyclin-E expression [11,12].

In both HIV-infected and SIV-infected individuals, plasma IFN- α concentration peaks around day 10 of acute infection and persists, in organs, during chronic pathogenic infections [13–15]. In contrast, in nonpathogenic SIV infection models, rapidly controlled IFN- α response is accompanied by preserved CD4⁺ T-cell compartment, suggesting a role in pathogenesis [16–18]. As in humans, rhesus macaque IFN- α family is composed of 13 closely related proteins that certainly unequally contribute to plasma IFN- α levels. The relative expression of these subtypes depends either upon the activating stimulus or the producing cell type [19,20]. At the cell surface, these molecules interact with the same membrane-associated receptor, although with different affinity, leading to variable antiproliferative activities [21].

Thymocyte differentiation also involves chemokine-induced migrations of the differentiating cells within thymic cortex and medulla [22]. The chemokines implicated in T-cell differentiation in primates remain barely studied. Nevertheless, similar to mice, one could expect CCL19, CCL21, CCL25, and CXCL12 to be the major factors implicated in intrathymic cell migrations [22,23].

In the present study, we evaluated the consequences of acute SIV infection on thymopoiesis in rhesus macaques. We measured the impact of SIV infection on the production of recent thymic emigrants (RTEs). We analyzed IFN- α subtype transcription in the thymus of acutely SIV-infected monkeys and tested their effect on thymocyte proliferation. On the same thymuses, we evaluated the expression of chemokines implicated in thymocyte migrations.

Methods

Animals and simian immunodeficiency virus infection

Eighteen Chinese rhesus macaques were intravenously inoculated with 50 AID₅₀ of the pathogenic SIVmac₂₅₁ isolate (provided by Dr Anne-Marie Aubertin, INSERM U544, Strasbourg, France). Blood was longitudinally sampled every 3–4 days from nine animals for 3 weeks [10 ml on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)]. The other nine macaques were euthanatized (intravenous injection of 10 ml of pentobarbital) at day 3 ($n=3$), 7 ($n=2$), 10 ($n=2$), and 14 ($n=2$) postinfection. The four animals sacrificed at day 10 and 14 postinfection were included in the longitudinal blood sample analysis. Healthy animals ($n=3$) served as controls. Thymuses were collected at necropsy and immediately treated or conserved. The animal experimentation ethical committee Paris 1 approved the experiments (n°2011–0001).

Quantification of plasma interferon- α

Plasma IFN- α was quantified using VeriKine Human Interferon-Alpha ELISA Kit according to the manufacturer's instructions (PBL InterferonSource, Piscataway, New Jersey, USA).

T-cell receptor excision circle and simian immunodeficiency virus-DNA quantifications

Simian sj T-cell receptor excision circle (TREC), DJ β 1TRECs (DJ β 1.1–1.6) and DJ β 2TRECs (DJ β 2.1–2.7) were quantified by multiplex nested qPCR using LightCycler480 technology (Roche Diagnostics, Meylan, France), together with the CD3 γ chain as housekeeping gene, as described [2,24,25]. TREC contents were adjusted to circulating naive (CD95⁺ CD28⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts (sjTREC/10⁵ naive T cells). Intrathymic precursor T-cell proliferation was estimated by the sj/ β TREC ratio as described in [2,4].

SIV DNA was quantified as described in [26]. Plasmid harboring a single copy of both CD3 γ and SIV-*Gag* amplicons was used to generate standard curves (see Table, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/QAD/A501> which shows Macaque-adapted primers and probes).

Chemokine mRNA quantification

CCL19, CCL21, CCL25, and CXCL12 mRNA quantifications were performed in triplicate as described [27]. Total mRNA was extracted using an RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions and reverse transcribed using the QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen). Specific cDNAs were quantified by duplex nested qPCR together with hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) as housekeeping gene, using similar conditions as for TREC quantifications (see Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/QAD/A501> which shows macaques adapted primers). qPCR was performed on 1/280th of the PCR products in LightCycler480 SYBR Green I Master (Roche), using 'inner' primers (10 min at 95°C, 40 cycles of 1 s at 95°C, 10 s at 64°C, 15 s at 72°C). To generate standard curves, plasmids containing a single copy of HPRT amplicon and a single copy of one chemokine amplicon were used.

Interferon- α subtypes mRNA quantification

Total mRNA was purified using an RNeasy kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions, including two steps of DNase treatment (RNase-Free DNase Set; Qiagen). Reverse transcription was performed using the QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen). Total IFN- α coding cDNAs were quantified using the same protocol as for chemokines (see Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/QAD/A501>). Plasmid harboring a single copy of both HPRT and IFN- α amplicons was used to generate standard curves.

IFN- α subtypes were quantified by heteroduplex tracking assay (HTA), adapted from [28]. Briefly, total IFN- α cDNA was amplified using 'inner' primers (15 min at 95°C, 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 5 min at 72°C). PCR products were then mixed with human IFN- α B2 or G probes synthesized using 'inner' primers containing fluorescein or Rox dyes (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and EDTA (2 mmol/l), denatured at 95°C for 5 min, and rapidly chilled on ice to allow random probe-to-target heteroduplex formation. Heteroduplexes were resolved on polyacrylamide gels (acrylamide/bisacrylamide ratio 19:1, 4% stacking gel and 12% running gel). Fluorescence was detected using a Typhoon 9400 (GE Healthcare, Aulnay-sous-Bois, France). IFN- α subtypes were identified and quantified using TotalLab Quant 11.3 (TotalLab, Newcastle Upon Tyne, UK). Absolute mRNA copy number of each IFN- α subtype was calculated using relative quantification of each subtype and absolute quantification of total IFN- α mRNA.

Production and function of interferon- α subtypes

Simian IFN- α subtype genes (numbered as they appear on the chromosome, starting by the closest to the centromere) were synthesized, cloned in pM+Ppgk.EP

expression vector (Cytheris S.A., Issy Les Moulineaux, France) and transiently transfected using FreeStyle Max CHO Expression System (Invitrogen, Saint-Aubin, France), according to manufacturer's instructions. Supernatants collected at day 7 posttransfection were concentrated 15-fold (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device; Merck Millipore, Molsheim, France) and treated using acidic purification method adapted from [29,30] (pH 2.0 for 6 days at 4°C). After centrifugation and dialysis against phosphate-buffered saline (PBS), the IFN- α subtypes were quantified on polyacrylamide gel using SYPRO-Orange (Sigma Aldrich).

The effect of the different IFN- α subtypes on thymocyte development was evaluated on fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified healthy simian triple-negative thymocytes (see flow cytometry sorting and analysis section) cultured during 14 days on OP9-hDL1 cells (provided by Dr N. Taylor, CNRS-UMR5535, Montpellier, France) with recombinant simian glycosylated IL-7 (5 ng/ml, Cytheris S.A.), Flt3L (5 ng/ml) (Miltenyi Biotec, Paris, France), and simian IFN- α subtypes added every other day (100 ng/ml). Thymocyte differentiation was evaluated by FACS using anti-CD4-peridinin-chlorophyll protein-cyanin5.5 (PerCP-Cy5.5) (clone L200; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and anti-CD8-pacific blue (clone RPA-T8, BD Biosciences).

In order to evaluate the impact of IFN- α subtypes on thymocyte proliferation, triple-negative thymocytes (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) were FACS-purified, labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; 2 μ mol/l; Invitrogen), and cultured for 12 days on OP9-hDL1 in the same conditions. At day 5, 9, and 12, cells were sampled and FACS-analyzed using anti-CD4-PerCP-Cy5.5 and anti-CD8-pacific blue. Thymocyte proliferation was evaluated by measurement of CFSE dilution at day 5, 9, and 12 on differentiated cells (double-positive, CD4⁺CD8⁺; SP4, CD4⁺CD8⁻, and SP8, CD4⁻CD8⁺). Analyses were performed using FlowJo 9.5.2 software (Treestar, Ashland, Oregon, USA).

Thymocytes flow cytometry sorting

Freshly isolated thymic cells from healthy macaques were stained with anti-CD3-fluorescein isothiocyanate (clone SP34-2; BD Biosciences), anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-pacific blue, and anti-sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1)-allophycocyanin (clone 218713; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Triple-negative cells, (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) were analyzed and sorted using a BD FACS ARIA III (BD Biosciences).

Peripheral blood mononuclear cell flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells were Ficoll-purified and stained using anti-CD3-fluorescein isothiocyanate, anti-CD4-PerC-Cy5.5, anti-CD8-pacific blue, anti-CD28-phycoerythrin (clone CD28.2; BD Biosciences),

anti-CD95-allophycocyanin (clone DX2; BD Biosciences), anti-CD31-Biotin (clone WM59; AbD Serotec, Colmar, France), and Streptavidin-phycoerythrin-TexasRed (BD Biosciences). Naive T cells ($CD3^+CD95^-CD28^+CD4^+$ and $CD8^+$ cells), RTEs ($CD3^+CD95^-CD28^+CD31^+CD4^+$ cells), central memory T cells (TCM, $CD3^+CD95^+CD28^+CD4^+$ and $CD8^+$ cells), and effector memory T cells (TEM, $CD3^+CD95^+CD28^-CD4^+$ and $CD8^+$ cells) were analyzed using FlowJo 9.5.2 software.

Immunohistochemistry-combined in-situ hybridization

Digoxigenin-labeled RNA probes were generated using digoxigenin (DIG) RNA Labeling Kit Sp6/T7 (Roche) according to manufacturer's recommendations from CCL19, CCL25, and CCL21-containing pCRII-Topo plasmids (Invitrogen).

Thymus cryosections ($12\ \mu\text{m}$) were fixed for 20 min in cold formalin buffer (Labonord, Fontenay-sous-Bois, France) and acetylated twice in 0.1 mol/l triethanolamine solution containing 0.25% acetic anhydride (Sigma Aldrich). Prehybridization (1 h at 58°C) and hybridization (3 days at 58°C) were performed in hybridization buffer [50% formamide, 2X saline-sodium citrate (SSC), 1X Denhardt's solution, 0.05 mol/l EDTA, 0.5 mg/ml salmon sperm DNA (Sigma Aldrich)] using 2 ng/ μl of probes.

After washing (15 min in 5X SSC and twice 30 min in 0.5X SSC), DIG was detected with alkaline phosphatase-labeled sheep anti-DIG antibody (Roche) in 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 2 h and revealed with NBT/BCIP (Roche) overnight. Sections were washed and fixed in 95% ethanol.

After saturation with PBS containing 0.5% BSA and incubation with anti-HLA-DR antibody (clone TAL.1B5; Abcam, Paris, France) for 1 h at room temperature (RT), specific immunostaining was revealed using ImmPRESS antimouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories, Nanterre, France), dehydrated and mounted in VectaMount medium (Vector Laboratories), according to the manufacturer's instructions.

Immunohistological staining

Thymus cryosections ($10\ \mu\text{m}$) were fixed for 20 min at 4°C in 2% paraformaldehyde/PBS, rinsed in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS at RT for 8 min, rinsed in PBS, and blocked with 5% BSA/2% normal goat serum in PBS at RT for 30 min. After blocking endogenous biotin with the Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories), sections were successively incubated overnight at 4°C with primary antibodies, rinsed in 0.5% Tween20/PBS, incubated at RT in the dark for 30 min with secondary antibodies,

rinsed in 0.5% Tween20/PBS, and incubated at RT in the dark for 15 min with Alexa Fluor 488 streptavidin (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France). Sections were washed in 0.5% Tween20/PBS and then in PBS alone, counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindol (Molecular Probes), and mounted in Fluoromount-G medium (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA).

Primary antibodies were polyclonal rabbit antihuman IFN- α (PBL InterferonSource) and mouse monoclonal antibodies to HLA-DR (clone TAL.1B5, IgG1; Abcam) or mouse monoclonal antibodies to CXCL12 (clone 79018, IgG1; R&D systems) and HLA-DR (clone TÛ36, IgG2b; BD Biosciences). Secondary antibodies were biotin-conjugated goat antirabbit antibody, Alexa Fluor 488-conjugated goat antimouse IgG1, Alexa Fluor 546-conjugated goat antimouse IgG1, and Alexa Fluor 546-conjugated goat antimouse IgG2b (Molecular Probes).

Results

Acute simian immunodeficiency virus infection modifies thymic physiology *in vivo*

To evaluate the consequences of SIV infection on thymic function, we analyzed naive T-cell subsets and TREC content in the blood of 12 macaques followed over the first 21 days of SIV infection (Fig. 1 and see Figure, Supplemental Digital content 3, <http://links.lww.com/QAD/A501> which shows T-cell subsets in SIV-infected macaques). Circulating RTEs ($CD31^+$ naive $CD4^+$ T cells [31]) counts gradually declined over the first 10 days, but rebounded to baseline values between day 10 and day 14 and subsequently plateaued (Fig. 1a). This was also the case for naive $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell counts as well as TCM $CD8^+$ and TEM $CD4^+$ (see Figure, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/QAD/A501>). In contrast, sjTREC frequencies remained constant over the first 10 days and then significantly declined at day 14 and subsequently plateaued (Fig. 1b). Finally, DJ β TREC frequencies increased up to day 10, dropped at day 14, and raised again by day 21 (Fig. 1c). As a consequence, the sj/ β TREC ratio, a marker for thymocyte proliferation [2], gradually declined over the first days of infection, with a nadir between day 7 and day 10 postinfection (median sj/ β TREC ratio: 10 and 4.6 at day 0 and nadir, respectively; $P=0.014$) and significantly rebounded by day 14 ($P=0.017$; Fig. 1d and see Figure, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/QAD/A501> which shows sj/ β TREC ratio and plasma IFN- α concentration in SIV-infected macaques).

Interestingly, the nadir of the sj/ β TREC ratio coincided with the peak of plasma IFN- α positivity between day 7 and day 10 (see Figure, Supplemental Digital Content 4,

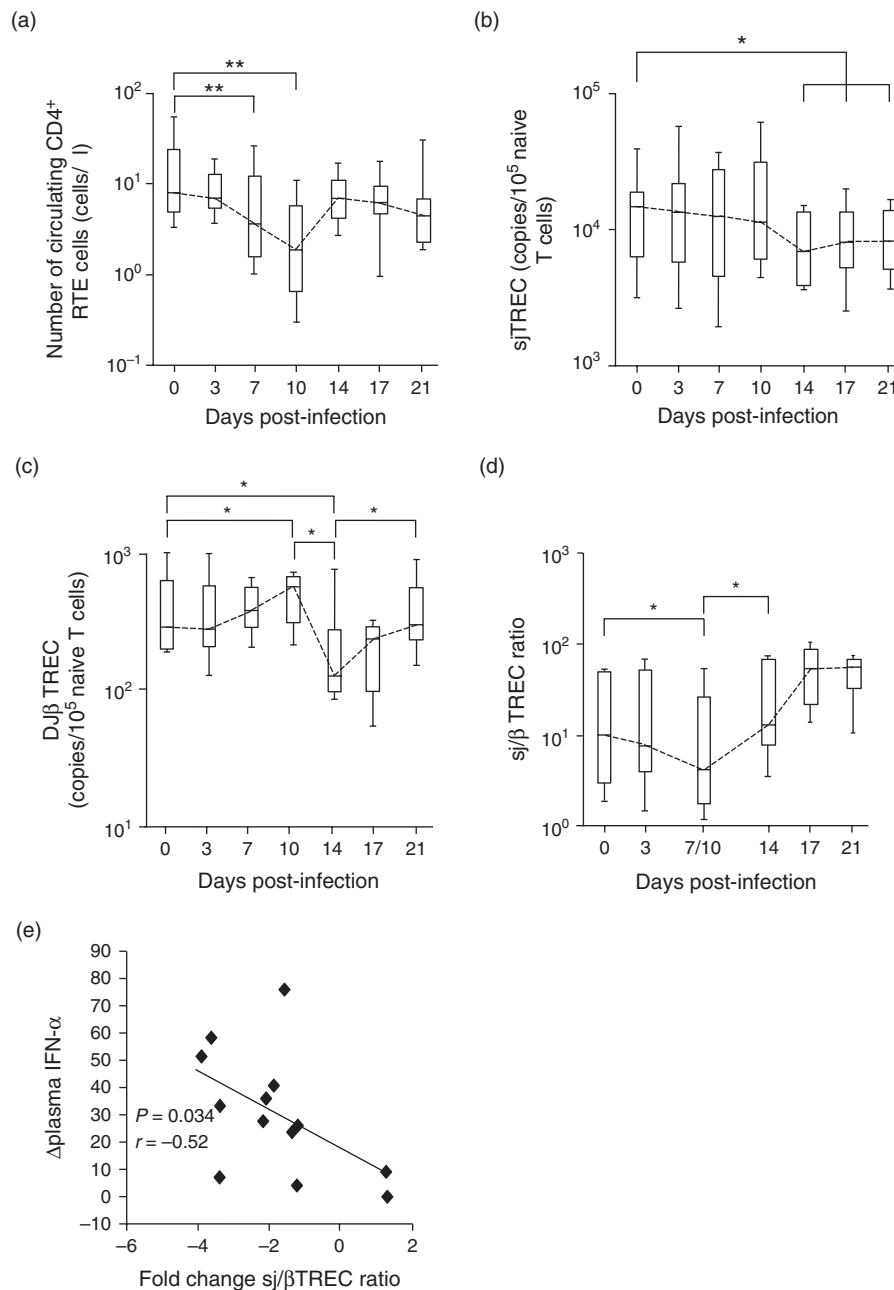


Fig. 1. Modification of thymic function during simian immunodeficiency virus acute infection. Numbers of circulating recent thymic emigrants (RTEs) (CD31⁺ naive CD4⁺ T cells (a) as well as sj T-cell receptor excision circle (TREC) (b) and DJβTREC (c) frequencies, adjusted to peripheral blood naive T-cell counts, measured in rhesus macaques ($n = 13$), over the first 21 days of acute simian immunodeficiency virus (SIV) infection. * $P < 0.05$ (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (d) Evolution of the sj/βTREC ratio over the first 21 days of acute SIV infection ($n = 13$). * $P < 0.05$ as compared to nadir sj/βTREC value between day 7 and 10 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (e) Relationships between changes in plasma interferon alpha (IFN-α) concentration (Δplasma IFN-α) and sj/βTREC ratio (fold change in sj/βTREC ratio), calculated between preinfection and at the peak of IFN-α production (day 7 or 10 postinfection). Spearman's rank correlation value and associated probability are shown ($n = 13$).

<http://links.lww.com/QAD/A501>). Moreover, the amplitude of plasma IFN-α response directly correlated with the decline of sj/βTREC ratio ($r = -0.52$, $P = 0.034$; Fig. 1e), suggesting a role for IFN-α in the impairment of thymocyte proliferation.

A subset of interferon-α subtypes is expressed in simian immunodeficiency virus-infected thymuses

In order to evaluate the role of IFN-α in the modifications of thymic function during acute SIV

infection, we analyzed IFN- α transcription in the thymus of acutely SIV-infected macaques. Surprisingly, whereas thymic infection gradually increased by day 3 (see Figure, Supplemental Digital Content 5, <http://links.lww.com/QAD/A501> which shows SIV DNA in thymuses from SIV-infected macaques), total IFN- α transcription – already detectable in the thymus of uninfected macaques – was not significantly changed following infection (Fig. 2a). However, the transcription pattern of the 12 IFN- α

subtypes was profoundly modified during this period. Indeed, whereas only a few IFN- α genes were transcribed in uninfected thymuses (Fig. 2b and c), thymic IFN- α expression rapidly diversified, by day 3 of infection (Fig. 2b). IFN- α 1, 2, and 3 were coexpressed in seven of the nine infected macaques, IFN- α 7 and 14 in six monkeys, and IFN- α 8 and 13 in six and five animals, respectively (Fig. 2d). Other subtypes were sporadically observed (Fig. 2d).

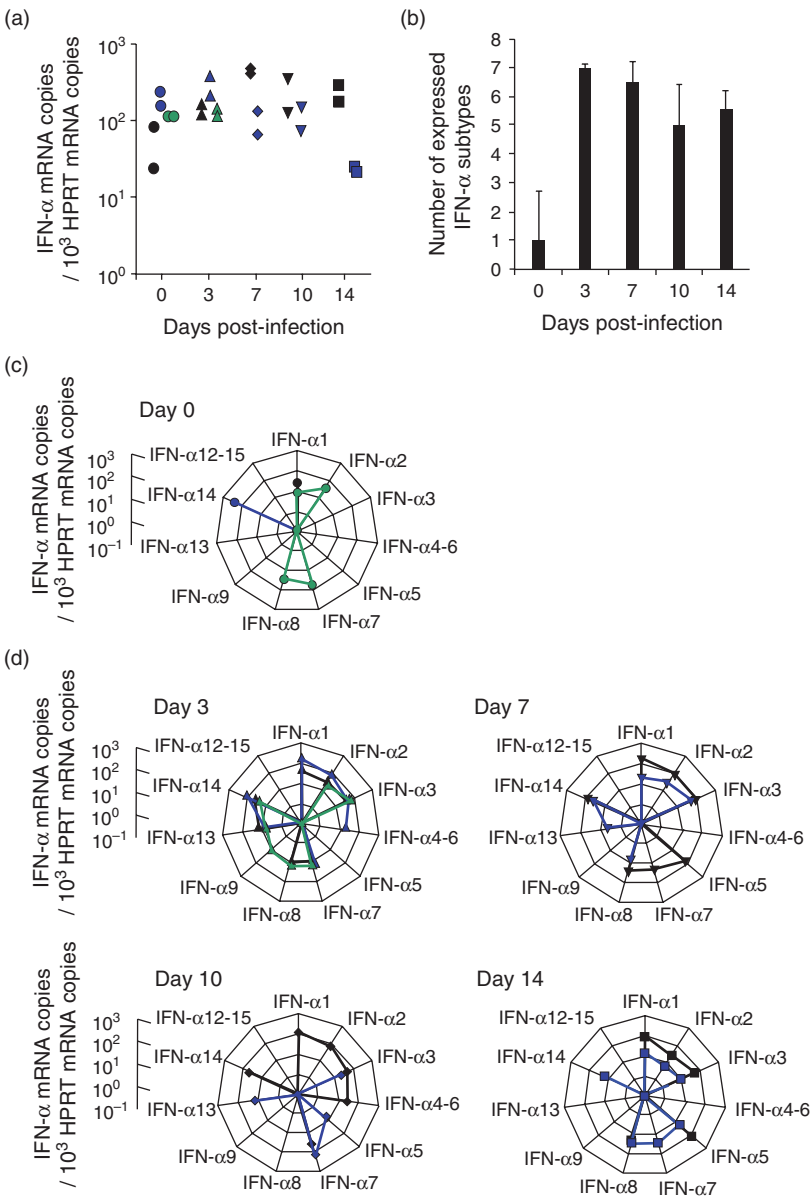


Fig. 2. Thymic interferon- α expression during acute simian immunodeficiency virus infection. (a) Global quantification of interferon alpha (IFN- α) expression following simian immunodeficiency virus (SIV) infection in thymuses sampled at day 0, 3, 7, 10, and 14 postinfection [copies per 10^3 hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA copies]. For each time point, each color represents an animal, two samples per animal. (b) Longitudinal evolution of the number of IFN- α subtypes expressed in thymuses following SIV infection. (c and d) Quantitative analysis of IFN- α subtypes expression in thymuses sampled at day 0, 3, 7, 10, and 14 postinfection (copies per 10^3 HPRT mRNA copies). For each time point, each color represents an animal, two samples per animal. (e) Immunohistofluorescent labeling for IFN- α (green) and Mamu-DR (red) on thymus cryosections sampled at day 0, 3, 7, and 10 postinfection. C, cortex; M, medulla. Dotted lines surround the medullas.

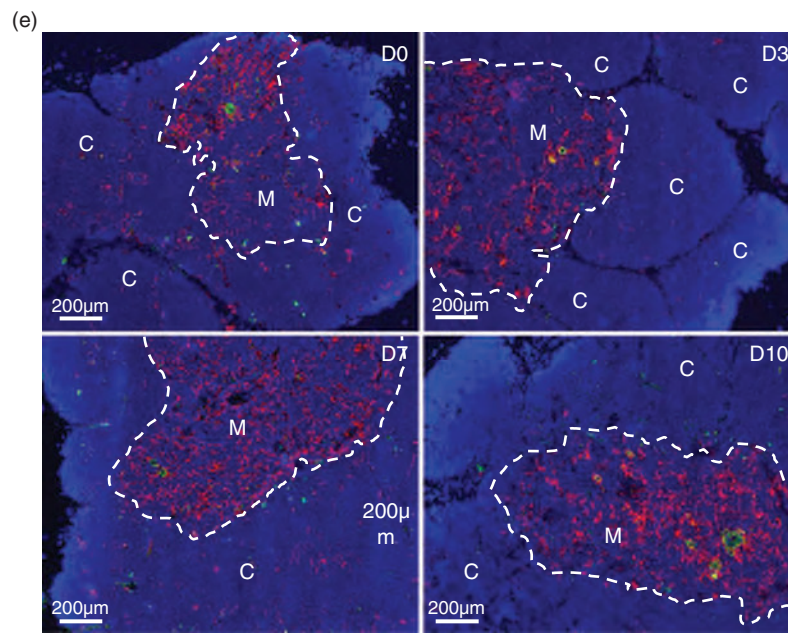


Fig. 2. (Continued).

Immunohistochemical labeling confirmed IFN- α expression in all the thymuses (Fig. 2e). Compatible with being IL-3R⁺ plasmacytoid dendritic cells (pDCs) [32,33], most IFN- α ⁺ cells were Mamu-DR⁺, located in the medulla and predominantly concentrated in Hassall's corpuscles (Fig. 2e).

Interferon- α subtypes expressed in infected thymuses inhibit thymocyte proliferation

The biological activity of the 12 simian IFN- α subtypes was evaluated on simian triple-negative thymocytes cultured on human Notch receptor ligand Delta-like 1-expressing murine stromal cells (OP9-hDL1) [34]. Addition of the different IFN- α subtypes led to reduced frequency of differentiated (double-positive, SP4 and SP8) cells (Fig. 3a). Only modest for IFN- α 1 and 6 (two-fold reduction as compared to cultures without IFN- α ; $P < 0.05$), the reduction of differentiated cell numbers was high in the presence of IFN- α 3, 4, 13, and 14 (80–90% reduction; $P < 0.05$ as compared to IFN- α 1 and 6) and quite complete (>90%) in cultures containing IFN- α 2, 5, 7, 8, 9, and 12/15 ($P < 0.05$ as compared to IFN- α 1 and 6; Fig. 3a). Longitudinal analysis showed that differentiated cell frequencies strongly increased between day 9 and 12 in cultures without IFN- α , but reached a plateau by day 5 in the presence of IFN- α 5, 6, and 13, suggesting antiproliferative effect of IFN- α subtypes (Fig. 3b).

We next evaluated thymocyte proliferation through longitudinal measurement of CFSE dilution in thymocytes differentiating on OP9-hDL1 cells (Fig. 3c and Fig. 4). In cultures without IFN- α , differentiated thymocytes (double-positive, SP4 and SP8) demonstrated higher proliferation than triple-negatives with more than

90% of differentiated cells having achieved at least nine divisions by day 9 (Fig. 4a and b). At any time point, triple-negative cell proliferation was delayed in the presence of IFN- α (Fig. 4a). However, IFN- α 2, 3, 4, 7, 8, and 12/15 more efficiently retarded cell proliferation than IFN- α 1, 6, 9, and 14, IFN- α 5 and 13 having an intermediate activity.

In contrast, in the presence of IFN- α , thymocyte differentiation occurred with very limited proliferation. Indeed, cells that differentiated in cultures containing IFN- α 2, 3, 4, 7, 8, and 12/15 barely proliferated (>85% inhibition as compared to medium alone; $P < 0.05$; Fig. 3c and 4b). Thus, three IFN- α subtypes transcribed in the thymus during acute SIV infection (IFN- α 2, 3, and 7) strongly impacted on thymocyte proliferation, still allowing their differentiation.

Simian immunodeficiency virus infection modifies thymic chemokine network

Both CCL25 (Fig. 5a, top panel) and CCL19 (Fig. 5a, central panel) mRNA levels were significantly increased by day 3 postinfection. In contrast, CXCL12 mRNA transcription was significantly lower in infected macaques than in controls (Fig. 5a, bottom panel). CCL25 mRNA was almost exclusively localized in the cortex (Fig. 5b, top panel), CCL19 mRNA in the medulla (Fig. 5b, bottom panel), and CXCL12 mostly in thymic subcapsular region (Fig. 5c). Finally, CCL21 transcription, mostly found in the medulla, remained stable following infection (see Figure, Supplemental Digital Content 6, <http://links.lww.com/QAD/A501> which shows thymic expression of CCL21 and S1PR1 during acute SIV infection). Of note, S1PR1 expression by SP4 and SP8 mature thymocytes was not modified following infection (see

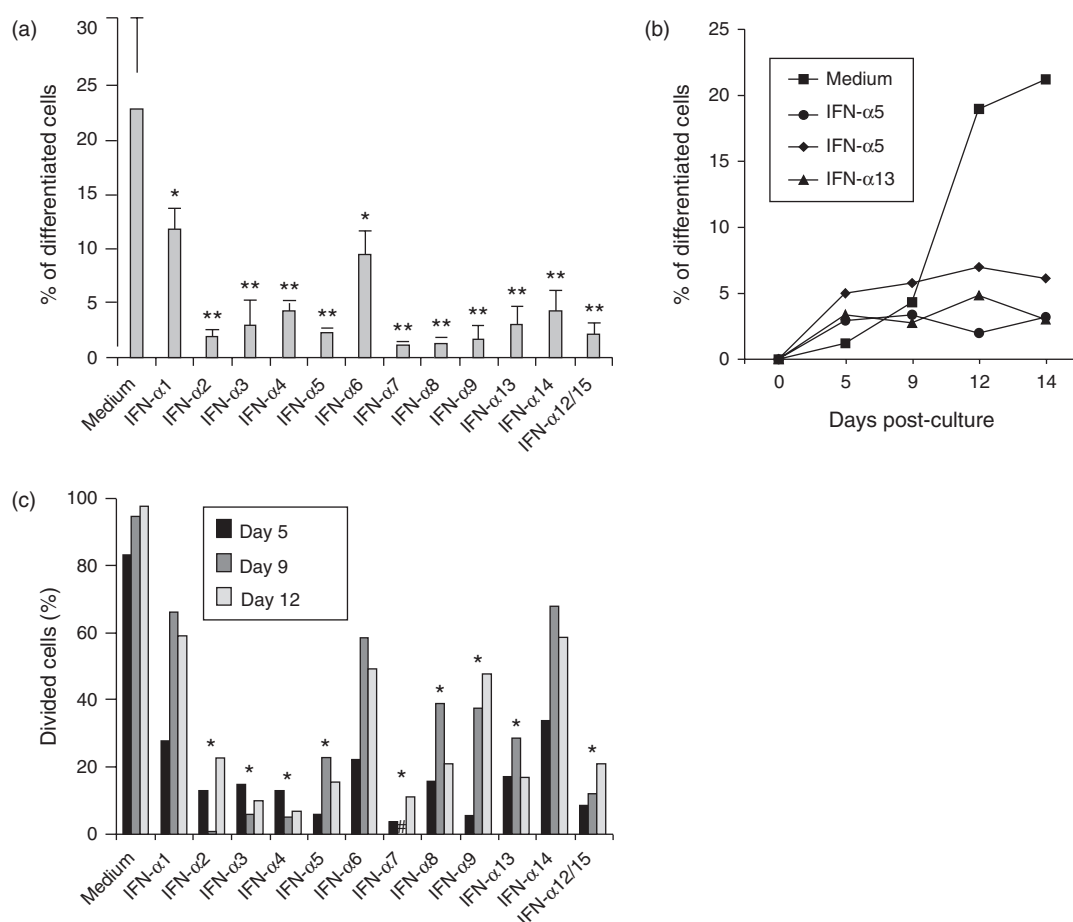


Fig. 3. Antiproliferative activity of interferon- α subtypes on differentiating thymocytes. (a) Frequency of differentiated (double-positive, SP4 and SP8) thymocytes after 14 days culture on OP9-hDL1 cells, in the presence of each of the 12 simian interferon alpha (IFN- α) subtypes (100 ng/ml, triplicate experiment). *Statistically significant as compared to medium alone containing cultures ($P < 0.05$; Mann-Whitney test). **Statistically significant as compared to IFN- α 1 and 6-containing cultures ($P < 0.05$; Mann-Whitney test). (b) Longitudinal analysis of differentiated (double-positive, SP4 and SP8) thymocyte frequency, in the presence of simian IFN- α 5, 6, and 13 (100 ng/ml). (c) Longitudinal analysis of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling in differentiated (double-positive, SP4 and SP8) cultured in the presence of the 12 simian IFN- α subtypes (100 ng/ml). Percentages of cells with more than three cell divisions are presented. #: not available. *Statistically significant as compared to medium alone containing cultures ($P < 0.05$; analysis of covariance).

Figure, Supplemental Digital Content 6, <http://links.lww.com/QAD/A501>.

Discussion

As expected, circulating T-cell numbers dropped during the first 10 days of SIV infection. However, whereas memory CD4⁺ T-cell numbers remained low after acute infection, all naive T-cell subsets rapidly rebounded by day 14 (Fig. 1 and see Figure, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/QAD/A501>). Analysis of TREC content demonstrates that thymic export contributes to this rebound. Indeed, despite stable sjTREC frequency, we observed a significant increase in DJ β TREC frequency, leading to reduced sj/ β TREC

ratio in the infected macaques (Fig. 1). Considering that modified sj/ β TREC ratio exclusively signs changes in thymocyte proliferation [2], this demonstrates that, on average, circulating RTEs at day 7/10 of SIV infection had a shorter intrathymic proliferative history than those sampled before infection. The only hypothesis that explains a global reduction of the sj/ β TREC ratio is the release in the RTE pool of new cells characterized by a reduced intrathymic proliferation (low sj/ β TREC ratio). Moreover, in order to impact on the global sj/ β TREC ratio, newly exported cells should be numerous enough to outnumber preexisting TREC-containing cells, suggesting substantial thymic export.

Surprisingly, total level of IFN- α mRNA levels remained stable in the thymus of SIV-infected macaques. However, in human thymus, thymocytes and medullary pDCs

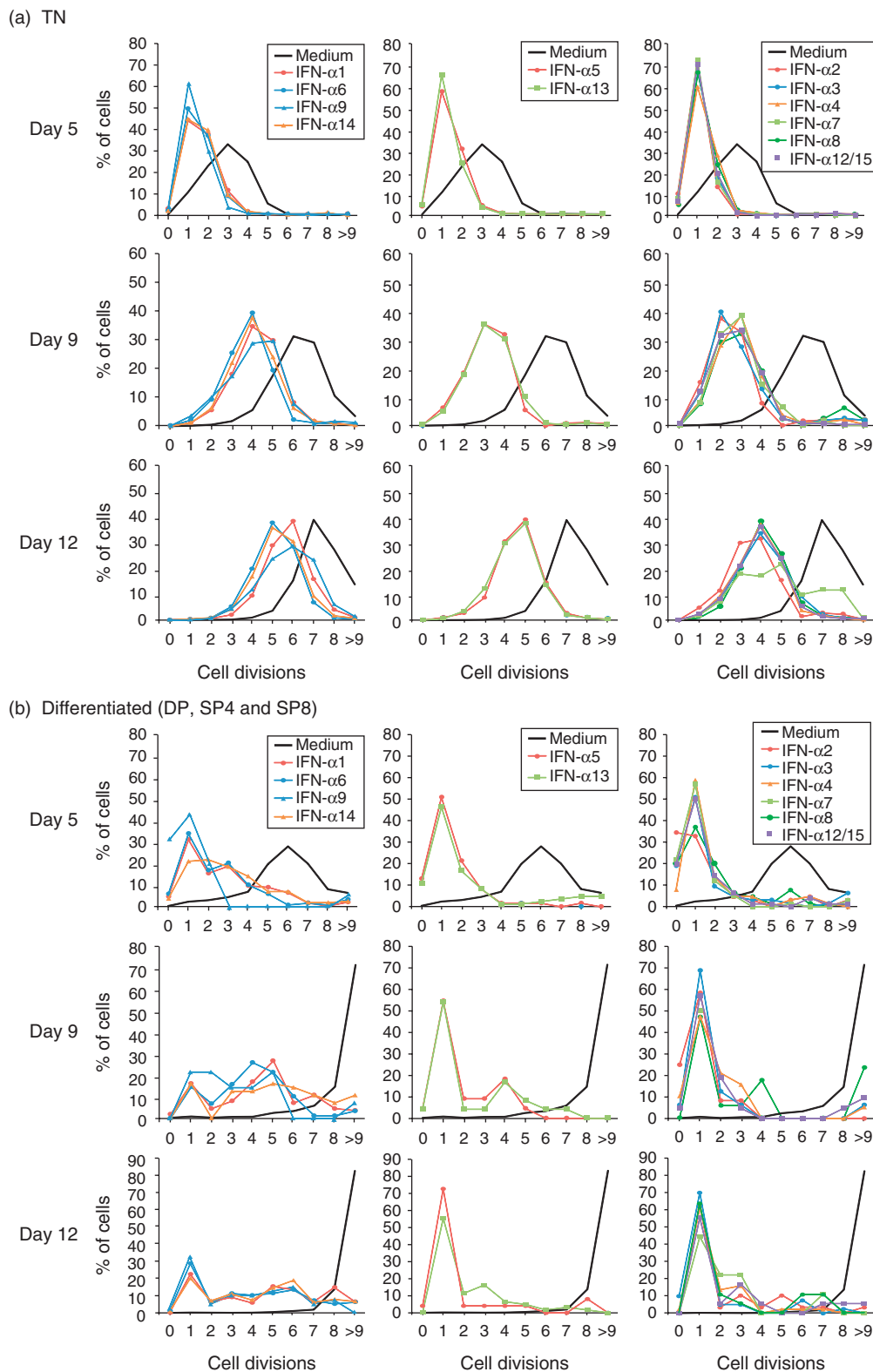


Fig. 4. Longitudinal quantification of thymocyte proliferation in interferon- α -containing cultures. Triple-negative thymocytes were carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled and cultured on OP9-hDL1 cells, in the presence of each of the 12 simian interferon alpha (IFN- α) subtypes (100 ng/ml) for 12 days. The frequency of cells having performed one to nine cell divisions after 5, 9, and 12 days of culture is shown for triple-negative (a) and differentiated (double-positive, SP4 and SP8; (b) cells. IFN- α subtypes are grouped according to their capacity to inhibit thymocyte proliferation: high (right panels), intermediate (central panels), and low (left panels).

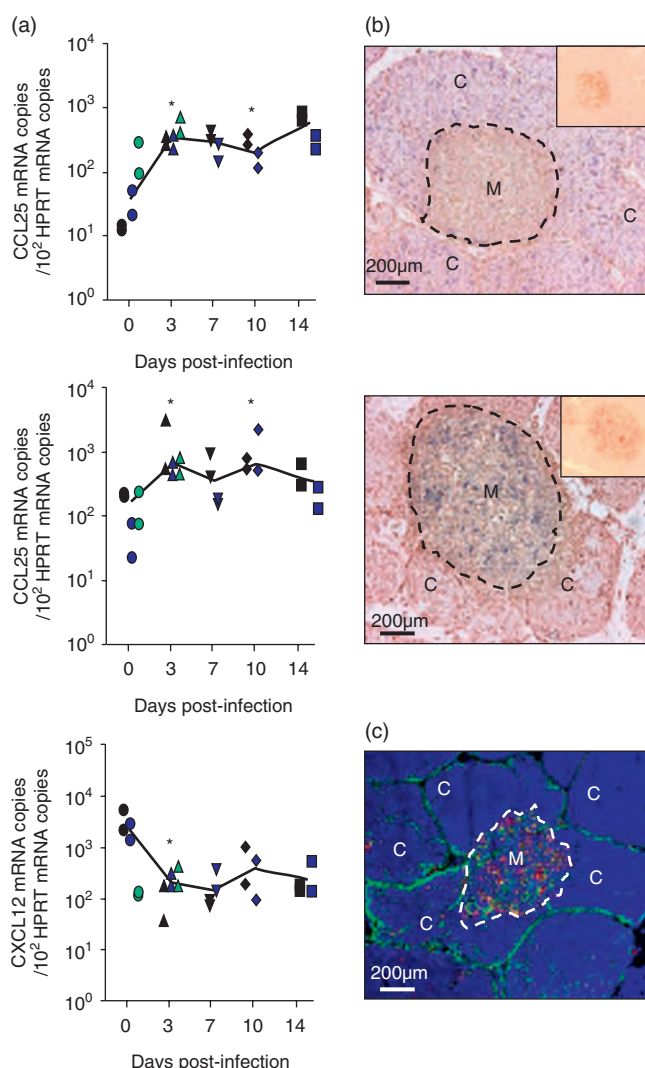


Fig. 5. Chemokine expression profiles in the thymus during acute simian immunodeficiency virus infection. (a) Quantification of CCL25 (top panel), CCL19 (middle panel), and CXCL12 (bottom panel) mRNA expression [copies per 10^2 hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA copies] in thymuses sampled at day 0, 3, 7, 10, and 14 postinfection. For each time point, each color represents one animal, two samples per animal. $*P < 0.05$ as compared to day 0 (Mann–Whitney one-tail *U*-test). (b) In-situ hybridization for CCL25 (top panel) and CCL19 (middle panel) mRNA (purple) on thymus cryosections from a macaque sacrificed at day 3 postinfection. Immunohistochemistry for Mamu-DR is shown in brown. (c) Immunohistofluorescent labeling for CXCL12 (green) and Mamu-DR (red) on thymus cryosections from a macaque sacrificed at day 3 postinfection. C, cortex; M, medulla.

constitutively express IFN- α [35]. During acute SIV infection, pDCs accumulate in lymphoid organs and represent the major source of IFN- α production ([14,36] and [37]). In contrast, IFN- α production is barely sustained by this cell type in chronic HIV/SIV infection [14,15]. In the thymus of acutely infected monkeys, IFN- α -producing cells were mostly localized within Hassall's bodies (Fig. 2e), suggesting a role of Hassall's corpuscle-associated DC-Lamp $^{+}$ dendritic cells in IFN- α production [38]. Moreover, at later time points, a punctuated labeling suggested diffusion of the cytokine into the tissue (Fig. 2e).

IFN- α is a complex family of proteins produced by most cell types in response to a large array of danger signals.

However, the expression of IFN- α subtypes depends on the stimuli and the cell type involved [19,20,39]. Moreover, after intraperitoneal Poly (I:C) treatment in mice, following the waves of IFN- α subtypes expression during the first 6 h, only a few IFN- α remained expressed in the longer term [28]. This is concordant with our observation of the expression of a group of IFN- α subtypes in the infected thymus and the stability of the expressed subtypes between day 3 and day 14 in the thymuses of SIV-infected macaques. However, thymic expressed IFN- α subtypes could differ from those expressed at the other sites sustaining acute viral replication as well as during chronic infection. A comprehensive analysis of the IFN- α subtypes produced in these various

organs could help in a better understanding of this particularly important response to viral infections.

Longitudinal analysis of differentiated ($CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ and $CD4^-CD8^+$) thymocytes in culture (Figs. 3 and 4) showed that whereas differentiated thymocytes had extensively proliferated in IFN- α -free cultures, in the presence of IFN- α , thymocyte differentiation occurred with reduced proliferation, leading to a smaller number of differentiated cells at day 14. However, in IFN- α 2, 3, 4, 7, 8, and 12/15-containing cultures, the vast majority of both triple-negative and differentiated cells barely cycled by day 5 (Fig. 4) while the frequency of differentiated cells reached a maximum (Fig. 3b). This strongly suggests that in normal conditions cells ready to differentiate at the beginning of the cultures proliferate and then eventually differentiate whereas, in the presence of specific IFN- α subtypes, they immediately differentiate. Accordingly, considering that cell cycling is a time-consuming process, IFN- α -induced inhibition of proliferation should accelerate thymopoiesis, provided that thymocyte trafficking is not also impaired during acute infection.

In mice and humans, a few chemokines are strongly involved in thymocyte trafficking [40]. Cortical CCL25 expression drives $CD34^+$ cells entry into and their migration through the cortex while they differentiate into DN3 cells [41]. CXCL12 plays a role in the retention of double-negatives and early double-positives in the outer cortex [42,43], where they proliferate between *TCRB* and *TCRA* rearrangements, before their migration to the medulla [44,45]. Finally, CCL19 is implicated in the migration of positively selected thymocytes from the cortex to the medulla, as well as to the transport of differentiated cells through the medulla [46], allowing sphingosine-1-phosphate-driven export of mature T cells through cortico-medullary blood vessels [47]. Accordingly, the increased transcription of both CCL19 and CCL25, together with decreased expression of CXCL12, is compatible with faster migration processes within the thymus. Together with the inhibition of thymocyte proliferation, such modifications of thymic chemokine networks most probably accelerate thymocyte migrations within the thymus and result in increased thymic export. Indeed, if thymopoiesis is accelerated during the first days after infection, thymic output should be composed of already mature cells close to leave the thymus at the time of infection caught up by cells that rapidly differentiated from double-negative cells in the presence of thymic IFN- α production. Enhanced thymic export should translate into an increase of the RTE compartment in SIV-infected macaques. Such an increased thymic output was observed in acutely HIV-infected patients [48]. However, massive cell homing from the blood to both lymphoid (spleen and lymph nodes) and nonlymphoid (gut, lungs, sexual mucosae) organs characterizes acute HIV/SIV infection. RTE migration into organ, which

strongly diminishes circulating RTE numbers, certainly masks the increased thymic export. Whether newly produced RTEs also home in organs remains to be established, but preferential migration of 'old' RTEs could help visualizing the change in sj/ β TREC ratio. Normalization of RTE counts and sj/ β TREC ratio after day 10 may suggest that preinfection RTEs return to circulation and dilute the RTEs produced during acute infection. However, in the long term, inhibition of thymocyte proliferation, reducing total number of lymphoid cells in the thymus, could affect thymic epithelial cells/thymocytes cross-talk and stromal cell survival [49], and, thus, may contribute to thymic involution and naive T-cell depletion that characterizes HIV infection [2,24].

Our data provide original evidence that deep modifications of thymic physiology occur during acute SIV infection. Local production of specific IFN- α subtypes that directly restrict immature thymocyte proliferation, together with altered thymic chemokine networks, may lead to accelerated thymocyte maturation, most probably resulting in transient increase of thymic output. Whether modification of IFN- α and chemokine productions within the thymus is a more general feature of acute viral infections remains to be established. However, an increased thymic output characterizes acute measles infection in both children and rhesus macaques [50], suggesting a common response to viral infections. Accordingly, identification of human IFN- α subtypes that, similarly to simian IFN- α 2, 3, 4, 7, and 12/15, impact on thymopoiesis could be of major importance to improve both natural and vaccine-elicited immune responses.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Céline Gomet and the staff of the Institut Pasteur primate center. The authors greatly acknowledge M. Andrieu, M. Favier, and F. Letourneur of the Cochin Institute Cytometry and Immunobiology, Morphology and Histology and Genomics Facilities. They also thank Drs Rafick-Pierre Sékaly, Anne Hosmalin, and Bruno Lucas for critically reading this article.

J.D., V.F.M., and B.C.dM. performed most of the experiments. M.R., A.C.C., and R.P. performed immunohistochemistry and in-situ hybridization experiments. S.F.M. and A.B. contributed to chemokine quantifications. S.R. and S.B. cloned simian IFN- α subtypes. J.D., M.R., A.C.C., and R.C. analyzed the data and wrote the article. All the authors discussed the results and commented on the article.

This work was carried out in partial fulfillment of J.D.'s PhD thesis at Université Paris Diderot, Paris, France. This work was supported by ANRS (Agence Nationale de

Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales), SIDACTION, INSERM, CNRS and Université Paris Descartes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the article.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 1999; **286**:958–961.
- Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* 2004; **21**: 757–768.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; **396**:690–695.
- Dion ML, Sekaly RP, Cheynier R. Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol Biol* 2007; **380**:197–213.
- Schuurman HJ, Krone WJ, Broekhuizen R, van Baarlen J, van Veen P, Golstein AL, et al. The thymus in acquired immune deficiency syndrome. Comparison with other types of immunodeficiency diseases, and presence of components of human immunodeficiency virus type 1. *Am J Pathol* 1989; **134**:1329–1338.
- Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, Scripture-Adams DD, Zack JA. Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat Med* 2001; **7**:459–464.
- Stoddart CA, Keir ME, McCune JM. IFN-alpha-induced upregulation of CCR5 leads to expanded HIV tropism in vivo. *PLoS Pathog* 2010; **6**:e1000766.
- Rosenzweig M, Connole M, Forand-Barabasz A, Tremblay MP, Johnson RP, Lackner AA. Mechanisms associated with thymocyte apoptosis induced by simian immunodeficiency virus. *J Immunol* 2000; **165**:3461–3468.
- Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 2009; **83**:3719–3733.
- Erickson S, Sangfelt O, Castro J, Heyman M, Einhorn S, Grander D. Interferon-alpha inhibits proliferation in human T lymphocytes by abrogation of interleukin 2-induced changes in cell cycle-regulatory proteins. *Cell Growth Differ* 1999; **10**:575–582.
- Xiao S, Li D, Zhu HQ, Song MG, Pan XR, Jia PM, et al. RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:16448–16453.
- Barata JT, Cardoso AA, Nadler LM, Boussiotis VA. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood* 2001; **98**:1524–1531.
- Abel K, Alegria-Hartman MJ, Rothausler K, Marthas M, Miller CJ. The relationship between simian immunodeficiency virus RNA levels and the mRNA levels of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and IFN-alpha/beta-inducible Mx in lymphoid tissues of rhesus macaques during acute and chronic infection. *J Virol* 2002; **76**:8433–8445.
- Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, Lebon P, Nascimbeni M, Perie L, et al. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 2008; **112**:4598–4608.
- Nascimbeni M, Perie L, Chorro L, Diocou S, Kreitmman L, Louis S, et al. Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood* 2009; **113**:6112–6119.
- Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat AS, Kunkel D, Petitjean G, et al. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* 2009; **119**:3544–3555.
- Catalfamo M, Wilhelm C, Tcheung L, Proschan M, Friesen T, Park JH, et al. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. *J Immunol* 2011; **186**:2106–2116.
- Diop OM, Ploquin MJ, Mortara L, Faye A, Jacquelin B, Kunkel D, et al. Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* 2008; **82**: 5145–5152.
- Hillyer P, Mane VP, Schramm LM, Puig M, Verthelyi D, Chen A, et al. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**:774–783.
- Puig M, Tosh KW, Schramm LM, Grajkowska LT, Kirschman KD, Tami C, et al. TLR9 and TLR7 agonists mediate distinct type I IFN responses in humans and nonhuman primates in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 2012; **91**:147–158.
- Lavoie TB, Kalie E, Crisafulli-Cabatu S, Abramovich R, DiGioia G, Moolchan K, et al. Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine* 2011; **56**:282–289.
- Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 2006; **7**:338–343.
- Vicente R, Swainson L, Marty-Gres S, De Barros SC, Kinet S, Zimmermann VS, et al. Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 2010; **22**:270–275.
- Dion ML, Bordi R, Zeidan J, Asaad R, Boulassel MR, Routy JP, et al. Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. *Blood* 2007; **109**:2912–2920.
- Parker R, Dutrieux J, Beq S, Lemerrier B, Rozlan S, Fabre-Mersseman V, et al. Interleukin-7 treatment counteracts IFN-alpha therapy-induced lymphopenia and stimulates SIV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in SIV-infected rhesus macaques. *Blood* 2010; **116**:5589–5599.
- Fabre-Mersseman V, Dutrieux J, Louise A, Rozlan S, Lamine A, Parker R, et al. CD4+ recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis. *AIDS* 2011; **25**: 1153–1162.
- Beq S, Rozlan S, Gautier D, Parker R, Mersseman V, Schilte C, et al. Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood* 2009; **114**:816–825.
- Demoulin T, Baron ML, Kettaf N, Abdallah A, Sharif-Askari E, Sekaly RP. Poly (I:C) induced immune response in lymphoid tissues involves three sequential waves of type I IFN expression. *Virology* 2009; **386**:225–236.
- Tovey MG, Begon-Lours J, Gresser I. A method for the large scale production of potent interferon preparations. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; **146**:809–815.
- Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; **14**:461–470.
- Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A, et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002; **195**:789–794.
- Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; **192**: 1785–1796.
- Keir ME, Stoddart CA, Linquist-Stepps V, Moreno ME, McCune JM. IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus. *J Immunol* 2002; **168**:325–331.
- La Motte-Mohs RN, Herer E, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* 2005; **105**:1431–1439.

35. Colantonio AD, Epeldegui M, Jesiak M, Jachimowski L, Blom B, Uittenbogaart CH. **IFN-alpha is constitutively expressed in the human thymus, but not in peripheral lymphoid organs.** *PLoS One* 2011; **6**:e24252.
36. Gurney KB, Colantonio AD, Blom B, Spits H, Uittenbogaart CH. **Endogenous IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection.** *J Immunol* 2004; **173**:7269–7276.
37. Bruel T, Dupuy S, Démoulin T, Rogez-Kreuz C, Dutrieux J, Corneau A, *et al.* **Plasmacytoid dendritic cell dynamics tune interferon-alfa production in SIV-infected cynomolgus macaques.** *PLoS Pathog* 2014; **10**:e1003915.
38. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, *et al.* **Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+ CD25+ regulatory T cells in human thymus.** *Nature* 2005; **436**:1181–1185.
39. Zaritsky LA, Dery A, Leong WY, Gama L, Clements JE. **Tissue-specific interferon alpha subtype response to SIV infection in brain, spleen, and lung.** *J Interferon Cytokine Res* 2013; **33**:24–33.
40. Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Romagnani S. **Chemokines and lymphopoiesis in human thymus.** *Trends Immunol* 2001; **22**:277–281.
41. Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE, Bhandoola A. **Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors.** *J Immunol* 2007; **178**:2008–2017.
42. Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, *et al.* **A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo.** *J Immunol* 2003; **170**:4649–4655.
43. Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. **Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus.** *J Immunol* 2003; **171**:4521–4527.
44. Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG, *et al.* **Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development.** *Blood* 2002; **99**:546–554.
45. Janas ML, Varano G, Gudmundsson K, Noda M, Nagasawa T, Turner M. **Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4.** *J Exp Med* 2010; **207**:247–261.
46. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, *et al.* **CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes.** *J Exp Med* 2004; **200**:493–505.
47. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, *et al.* **Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1.** *Nature* 2004; **427**:355–360.
48. Sempowski GD, Hicks CB, Eron JJ, Bartlett JA, Hale LP, Ferrari G, *et al.* **Naive T cells are maintained in the periphery during the first 3 months of acute HIV-1 infection: implications for analysis of thymus function.** *J Clin Immunol* 2005; **25**:462–472.
49. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC. **Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR.** *J Exp Med* 2003; **198**:757–769.
50. Permar SR, Moss WJ, Ryon JJ, Douek DC, Monze M, Griffin DE. **Increased thymic output during acute measles virus infection.** *J Virol* 2003; **77**:7872–7879.

Table S1: Oligonucleotides used for TRECs and SIV DNA real-time PCR quantification

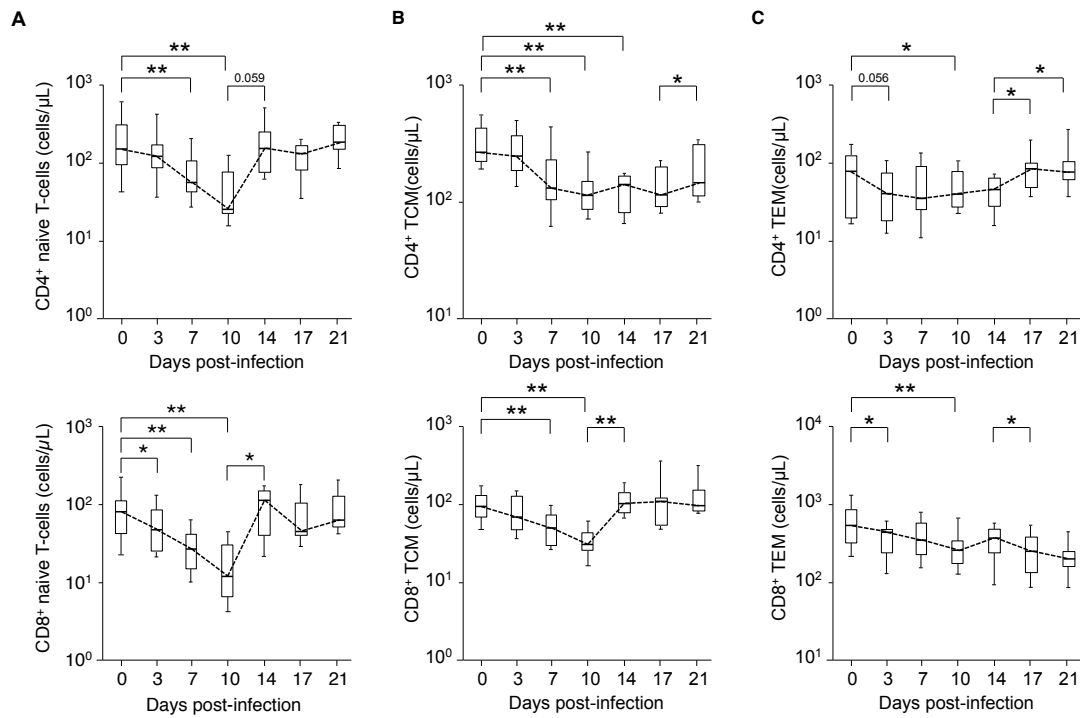
Name	Sequence
CD3-out5	ACTGACATGGAACAGGGGAA
CD3-out3	AGCTCTGAAGTAGGGAACATAT
CD3-in5	GGCTATCATTCTTCTCAAGGTA
CD3-in3	TTCTGGCCTATGCCCTTTT
sj-Out5	CTCTCCTATCTCTGCTCTGAA
sj-Out3	ACACTTGCTCCGTGGTCTGT
sj-In5	TGATGCCACATCCCTTTCAA
sj-In3	GTGCTGGCATCAGAGTGTGT
1.1-Out	AACCTAGGACCCTGTGGATG
1.2-Out	CTCTCTATGCCTTCAATGTG
1.3-Out	AAGGGAACACAGAGTACTGGAA
1.4-Out	TGGACTTGGGGAGGCAGGA
1.5-Out	GAAACTGAGAACACAGCCAAGAA
1.6-Out	ATCCTCCCTCTTATGTGCATGG
Db1-Out	CTCATCTGGGCCTGTCTTGT
1.1-In	TGTCTCCATCCTAGCCAGG
1.2-In	TCCGTACAGGGAAAAGTGG
1.3-In	TCCCAACCTCTGCCTGAAT
1.4-In	AGGAGTGGAAGGCAGCAGGT
1.5-In	CTCATAAAATGTGGGTCACTGGA
1.6-In	TGAATCCAGGCAGAGAAAGG
Db1-In	TGACCCAGGAGGAAAGAAG
2.1-Out	CTCCTCTGCAAATTGGTGGT
2.2-Out	CACCGTGCTAGGTAAGAA
2.3-Out	TACTGGGTAAGGAGGCGGTT
2.4-Out	GGCTGACAGTGCTCGGTAA
2.5-Out	GCCGGGACCCGGCTCTCAGT
2.6-Out	TGACCAAGAGACCCAGTA
2.7-Out	TGACCGTGCTGGGTGAGTT
Db2-Out	GGGACCAGCCCCAGAGA
2.1-In	CCAGCTAACTCGAGACAGGAA
2.2-In	GAACCCTGTTCTTAGGGGAGT
2.3-In	GAAGGACCCGAGCTGAGT
2.4-In	GCGTCGCAGGGCCAGTTT
2.5-In	CGGCTCTCAGTGCTGGGTAA
2.6-In	GTCTGGTTTTTGCAGGGAGT
2.7-In	GGAGCTCGGGGAGCCTTA
Db2-In	TCCACCTGGTAGCTGCATT
P1-CD3	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-Fluo
P2-CD3	Red640-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC-P
P1-sj	AATAAGTTCAGCCCTCCATGTCACACT-Fluo
P2-sj	Red640-TGTTTTCCATCCTGGGGAGTGTTTCA-P
P1-Db1	CTGGGAGTTGGGACCGCCAGAGAGGT-Fluo
P2-Db1	Red640-TTTGTAAGGTTTCCCGTAGAGTTGAATCATTGTG-P
P1-Db2	ATGATTCAGGTAGAGGAGGTGCTTTTACAA-Fluo
P2-Db2	Red640-AAACCCTGCTGCAATAAACATCCCCACCCAGC-P
Gag-SIV-out5	CAACAAGGACAGCTTAGGGA
Gag-SIV-out3	TTGACAGGCCGTCAGCATTT
Gag-SIV-In5	CCGTCAGGATCAGATATTGCA
Gag-SIV-In3	GAAACTATGCCAAAAACAAGT

Table S1: Oligonucleotides used for TRECs and SIV DNA real-time PCR quantification

Name	Sequence
CD3-out5	ACTGACATGGAACAGGGGAA
CD3-out3	AGCTCTGAAGTAGGGAACATAT
CD3-in5	GGCTATCATTTCTTCAAGGTA
CD3-in3	TTCCTGGCCTATGCCCTTTT
sj-Out5	CTCTCCTATCTCTGCTCTGAA
sj-Out3	ACACTTGCTCCGTGGTCTGT
sj-In5	TGATGCCACATCCCTTTCAA
sj-In3	GTGCTGGCATCAGAGTGTGT
1.1-Out	AACCTAGGACCCTGTGGATG
1.2-Out	CTCTCTATGCCTTCAATGTG
1.3-Out	AAGGGAACACAGACTACTGGAA
1.4-Out	TGGACTTGGGGAGGCAGGA
1.5-Out	GAAACTGAGAACACAGCCAAGAA
1.6-Out	ATCCTCCCTCTTATGTGCATGG
Db1-Out	CTCATCTGGGCCTGTCCTTGT
1.1-In	TGTCCTCCATCCTAGCCAGG
1.2-In	TCCGTACAGGGAAAAGTGG
1.3-In	TCCCAACCTCTGCCTGAAT
1.4-In	AGGAGTGGAAGGCAGCAGGT
1.5-In	CTCATAAAATGTGGTCACTGGA
1.6-In	TGAATCCAGGCAGAGAAAAGG
Db1-In	TGACCCAGGAGGAAAGAAG
2.1-Out	CTCCTCTGCAAATTGGTGGT
2.2-Out	CACCGTGCTAGGTAAGAA
2.3-Out	TACTGGGTAAGGAGGCGGTT
2.4-Out	GGCTGACAGTGCTCGGTAA
2.5-Out	GCCGGGACCCGGCTCTCAGT
2.6-Out	TGACCAAGAGACCCAGTA
2.7-Out	TGACCGTGCTGGGTGAGTT
Db2-Out	GGGACCAGCCCCAGAGA
2.1-In	CCAGCTAACTCGAGACAGGAA
2.2-In	GAACCCTGTTCTTAGGGGAGT
2.3-In	GAAGGACCCGAGCTGAGT
2.4-In	GCGTCGCAGGGCCAGTTT
2.5-In	CGGCTCTCAGTGCTGGGTAA
2.6-In	GTCTGGTTTTTGCGGGGAGT
2.7-In	GGAGCTCGGGGAGCCTTA
Db2-In	TCCCACCTGGTAGCTGCATT
P1-CD3	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-Fluo
P2-CD3	Red640-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC-P
P1-sj	AATAAGTTCAGCCCTCCATGTCACACT-Fluo
P2-sj	Red640-TGTTTTCCATCCTGGGGAGTGTTTCA-P
P1-Db1	CTGGGAGTTGGGACCGCCAGAGAGGT-Fluo
P2-Db1	Red640-TTTGTAAAGGTTTCCCGTAGAGTTGAATCATTGTG-P
P1-Db2	ATGATTCAGGTAGAGGAGGTGCTTTTACAA-Fluo
P2-Db2	Red640-AAACCCTGCTGCAATAAACATCCCCACCCAGC-P
Gag-SIV-out5	CAACAAGGACAGCTTAGGGA
Gag SIV-out3	TTGACAGGCCGTCAGCATTT
Gag-SIV-In5	CCGTCAGGATCAGATATTGCA
Gag SIV-In3	GAAACTATGCCAAAAACAAGT

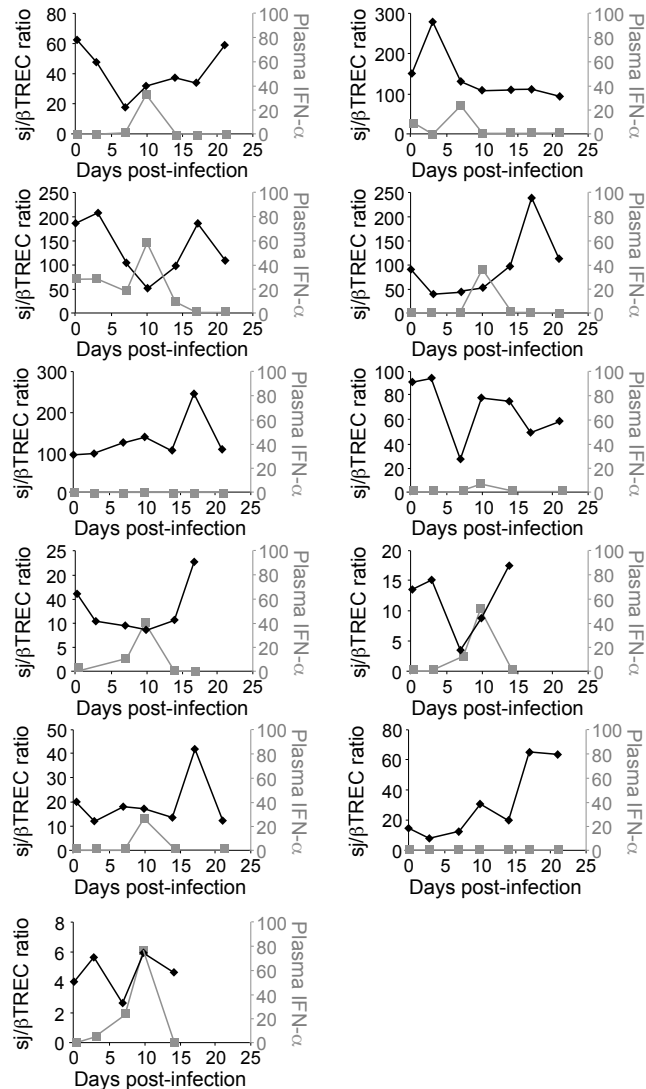
Table S2: Oligonucleotides used for IFN- α and chemokine mRNA real-time PCR quantification

Name	Sequence
HPRT-Out5	CTGAACGTCCTTGCTCGAGAT
HPRT-Out3	CGACCTTGACCATCTTTGGA
HPRT-In5	CACATTGTAGCCCTCTGTGT
HPRT-In3	CTGACCAAGGAAAGCAAAGT
IFNa-Out5	TCTCCTGCCTGAAGGACAGA
IFNa-Out3	CGACCTTGACCATCTTTGGA
IFNa-In5	ATGATTTCTGCTCTGACAACCT
IFNa-In3	AAGCCATCTCTGTCTCCAT
CCL19-Out5	ACCGTTGGCCTGCCTCTGTT
CCL19-Out3	CTGCTGCGGCGCTTCATCTT
CCL19-In5	CAGCCTGCTGGTTCTCTGGA
CCL19-In3	TCCTCTGCAGTCTCTGGAT
CCL21-Out5	CCTCAGCTCTGGCCTCTTA
CCL21-Out3	TCACTGGGCTATGGCCCTTTA
CCL21-In5	ATGGCTCAGTCACTGGCTCT
CCL21-In3	CTATGGCCCTTTAGGGGTCT
CCL25-Out5	CACACCCAAGGTGTCTTTGA
CCL25-Out3	TTAGCTGATGTCAGGAGGGA
CCL25-In5	TTATCGGATCCAGGAGGTGA
CCL25-In3	CTGCTGGTGGGATTGCTAAA
CXCL12-Out5	GTCAGCCTGAGCTACAGAT
CXCL12-Out3	TTTCTCCAGGTA CTCTGAA
CXCL12-In5	TACAGATGCCCATGCCGATT
CXCL12-In3	TCGGGTCAATGCACACTTGT



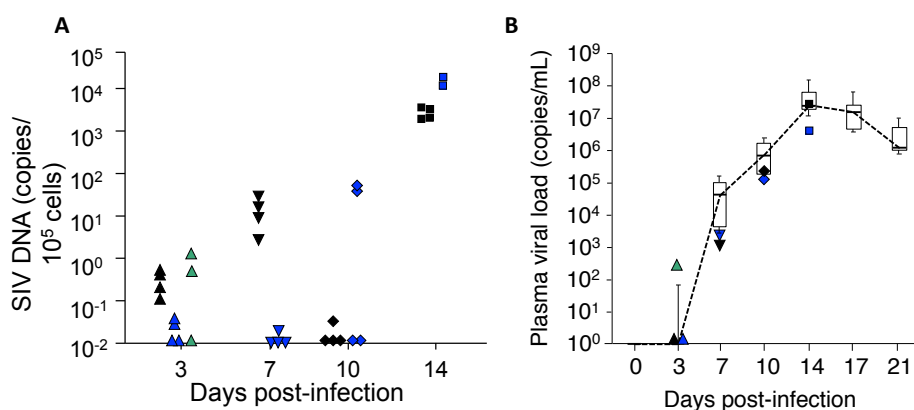
Supplemental Digital Content 3: Longitudinal analysis of T-cell subsets in SIV-infected rhesus macaques.

Circulating naïve (**A**), central memory (TCM; **B**) and effector memory (TEM; **C**) CD4⁺ (Top panels) and CD8⁺ (Bottom Panels) T-cells were quantified in peripheral blood cells from SIV-infected rhesus macaques over the first 3 weeks of infection (n=13). *: p<0.05; **:p<0.01 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).



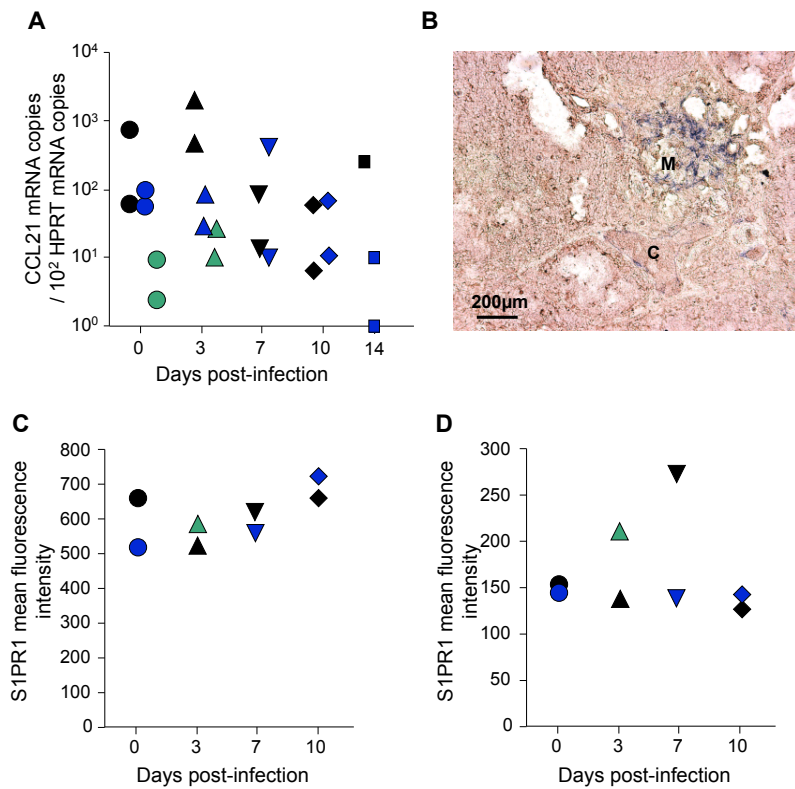
Supplemental Digital Content 4: Evolution of the sj/βTREC ratio and plasma IFN-α concentration in SIV-infected macaques.

The sj/βTREC ratio, a molecular marker of intra-thymic precursor T-cell proliferation, was longitudinally measured during the first 3 weeks of SIV infection, together with plasma IFN-α concentration. In most infected animals, the peak of IFN-α coincides with the nadir of sj/βTREC ratio.



Supplemental Digital Content 5: Quantification of proviral SIV DNA in thymuses and plasma viral load from SIV-infected macaques.

(A) Quantification of SIVgag DNA (copies per 10⁵ cells as estimated by CD3 γ gene quantification) in thymuses sampled at day 3, 7, 10 and 14 pi. For each time point, each color represents one animal. For each animal, each dot represents a PCR replicate. Dots on the abscise axis represent replicates with undetectable SIVgag DNA. (B) Plasma viral load of the animals (copies per mL of plasma). For each time point, colored dots represents the animals which were euthanized for thymic analysis.



Supplemental Digital Content 6: CCL21 and S1PR1 expression in the thymus during acute SIV infection.

(A) Quantification of CCL21 mRNA expression (copies per 10² HPRT mRNA copies) in thymuses sampled at day 0, 3, 7, 10 and 14 pi. For each time point, each color represents one animal, 2 samples per animal. (B) *In situ* hybridization for CCL21 on thymus cryosections from a macaque sacrificed at day 3 pi. Immunohistochemistry for Mamu-DR is shown in brown (M: Medulla; C: Cortex). S1PR1 expression on SP4 (C) and SP8 (D) thymocytes sampled at day 0, 3, 7, and 10 pi. For each time point, each color represents one animal.

D. Synthèse des résultats de l'étude n°2

L'infection des macaques rhésus chinois par le SIV_{mac} a de grandes conséquences sur le pool de lymphocytes T du compartiment CD4 et CD8 en périphérie. Des analyses longitudinales de prélèvements sanguins obtenus au cours de la phase aiguë de l'infection ont révélé notamment un déclin transitoire des sous-populations naïves. Une lymphopénie significative est observée dès le jour 3pi dans le compartiment CD4⁺ et dès J7 pi dans le compartiment naïf CD8⁺. De façon intéressante, très vite, un rebond du nombre de ces cellules est observé au jour 14 après infection. Ce retour à la normale des cellules naïves pourrait être la conséquence, du moins en partie, d'une production thymique augmentée.

1. Mesure des TREC

Pour mieux comprendre le rebond des cellules naïves dans la circulation sanguine, nous avons évalué la fonction thymique en quantifiant les TREC dans les PBMC des animaux suivis pendant toute la phase aiguë de l'infection SIV. La quantification des sjTRECs montre que ce paramètre demeure stable dans la population des RTE. En revanche, la fréquence des DJβTRECs dans cette population augmente dès le septième jour après infection avant de retourner à des valeurs initiales à J14pi. En conséquence, le ratio sj/βTRECs diminue donc à J7 et J10pi pour revenir à des valeurs proches de l'état initial à J14pi.

Ces résultats montrent que pendant les premiers jours après l'infection SIV (i) la population des RTE est remplacée partiellement par des cellules nouvellement produites, seule façon de modifier de façon substantielle le rapport sj/βTRECs et (ii) que les cellules nouvellement produites ont moins proliféré dans le thymus (possédant un rapport sj/βTRECs faible) que celles présentes dans le sang avant l'infection. Cette modification du rapport sj/βTRECs des cellules circulantes suggère également que la vaste majorité des RTE du sang sont relocalisés dans les organes au cours des premiers jours suivant l'infection puis retournent dans la circulation sanguine à partir du jour 14 (retour à la normale du rapport sj/βTRECs).

2. Impact de l'infection SIV sur l'expression des chimiokines

Pour aller plus loin dans l'étude de la fonction thymique et après avoir mis en évidence l'infection du thymus dès le jour 7pi, nous avons mesuré l'impact de l'infection SIV sur les processus de migration des thymocytes. Nous avons quantifié l'expression des chimiokines CCL19, CCL21, CCL25 et CXCL12 essentielles à la thymopoïèse. Les résultats montrent une augmentation de la concentration des ARNm codant pour CCL19 et CCL25 responsables de la migration intra thymique et la sortie des thymocytes. En revanche, l'expression de CXCL12, impliquée dans la rétention des thymocytes au niveau de la zone sous-capsulaire, est diminuée. Les quantités de transcrits codant pour CCL21 ne varient pas.

Ces données vont dans les sens d'une accélération de la migration des thymocytes tant avant qu'après leur maturation et une rétention diminuée des thymocytes dans la zone sous-capsulaire, phénomène important pour permettre leur prolifération et diminuer leur vitesse de maturation dans le thymus.

3. Conséquences de l'infection sur la fonction thymique

En conclusion, pendant les premiers jours après infection par le SIVmac, la population des RTE disparaît en partie de la circulation pour être remplacée par de nouvelles cellules ayant un passé prolifératif intra-thymique moindre. Les modifications de l'expression des chimiokines laissent penser que l'un des mécanismes de prolifération moindre dans le thymus impliquerait une migration accélérée des thymocytes. Ces données suggèrent (i) qu'une partie des cellules naïves quitte très vite la périphérie pour gagner les organes infectés et que (ii) la thymopoïèse est accélérée, participant au retour à la normale du nombre de cellules naïves dès le jour 14 après l'infection.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

I. Choix pertinent du modèle expérimental pour l'étude la phase aiguë de l'infection par le SIVmac

Depuis l'identification des SIV, la recherche bénéficie des modèles d'infections de PNH pour mieux comprendre la pathogenèse de la maladie associée à l'infection par le VIH, évaluer l'efficacité de traitements antirétroviraux et tester des candidats vaccins. Historiquement, le macaque rhésus indien infecté par le SIVmac est le modèle animal expérimental le plus étudié. Ce modèle résume en effet les trois phases caractéristiques de la pathogenèse liée à l'infection par le VIH-1 en une échelle de temps abordable pour qui veut évaluer les effets d'une stratégie thérapeutique sur l'issue de la maladie.

Le fait que les événements survenant au cours de la phase aiguë de l'infection dictent la progression de la maladie suggère qu'une meilleure compréhension du dialogue entre l'hôte et le virus durant cette période est requise pour figurer comment le virus échappe au système immunitaire. Bien que la plupart des études de la pathogenèse de l'infection aient été réalisées sur le modèle du macaque indien, il est maintenant de plus en plus admis que l'infection du macaque rhésus chinois par le SIVmac mime plus fidèlement les événements virologiques et immunologiques connus chez l'Homme (Trichel et al., 2002), (Ling, Veazey, Luckay, et al., 2002a), (Monceaux et al., 2007) et pour revue (Y. Zhou et al., 2013). Par conséquent, il semble plus pertinent de mener l'étude fondamentale de la physiopathologie de l'infection dans ce modèle. Mon travail de doctorat apporte des éléments pour mieux comprendre l'infection aiguë par le SIVmac chez le macaque rhésus chinois.

II. Le niveau d'infection du tractus intestinal en phase aiguë est hétérogène

Pour comprendre la progression de la pathologie associée au VIH-1, il est crucial de clarifier où, quand et comment le virus se réplique dans l'organisme. L'infection de la muqueuse rectale en phase aiguë d'infection est bien documentée chez le macaque rhésus chinois (Kaup et al., 2001), (Couëdel-Courteille et al., 2003), (Ribeiro dos Santos et al., 2011). Chez les animaux d'origine indienne, quelques études montrent la détection du SIV dans la muqueuse d'un segment intestinal en particulier, par exemple dans le jéjunum (Mattapallil et al., 2005) ou bien encore le colon (Q. Li et al., 2005).

Cependant, aucune étude n'a visé à comparer la dissémination et la réplication virale dans les différents segments du tractus digestif et les ganglions au cours des jours suivants l'infection par le SIV.

Nous avons quantifié l'ADN et l'ARN viral dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le colon ascendant et descendant à J3, J7, J10 et J14 après infection des animaux par voie intra-veineuse, ainsi que dans les ganglions axillaires et mésentériques. La sensibilité de notre méthode de quantification de l'ADN viral nous permet de détecter jusqu'à une copie d'ADN pour 100 000 cellules (Fabre-Mersseman et al., 2011). La quantité absolue d'ARNm viral et d'ARNm codant HPRT est mesurée par quantification absolue en RT-qPCR (voir matériel et méthodes en C). La charge virale ADN reflète la quantité totale d'ADN, intégré (provirus) ou non intégré (cercles d'ADN viral 1-LTR ou 2-LTR). La détection de l'ARN viral nous permet d'estimer le niveau de réplication virale, bien que notre méthode de quantification ne différencie pas l'ARN viral présent dans les virions de l'ARN viral intracellulaire complet ou épissé. Bien qu'une mesure de l'ARN intracellulaire refléterait plus précisément la réplication virale, la mesure de l'ARN viral total donne une bonne estimation de la productivité de l'infection (Pasternak et al., 2008).

Dans un premier temps, il convient de noter que, dans notre étude, la détection de l'ADN SIV précède celle de l'ARN SIV dans tous les organes testés. Deux hypothèses peuvent être envisagées : (i) les cellules infectées que nous détectons dans les organes auraient été infectées préalablement à leur migration dans les tissus étudiés ou (ii) notre méthode de quantification de l'ARN viral dans les tissus serait moins sensible que celle de l'ADN viral. Cette dernière hypothèse nous semble la plus probable. En effet, la méthode employée pour détecter l'ARN viral nécessite la purification des ARN totaux suivie de la transcription inverse, deux étapes à faible rendement. Une autre technique de PCR en temps réel utilisant des sondes Taqman spécifiques du virus est adoptée dans une étude récente où l'ARN du SIV est détecté dans le sang des animaux dès 2,5 jours après infection {Hirao:2014kk}. Soulignons cependant que cette étude a été menée sur des animaux infectés par voie intra-veineuse avec une dose de 1000 TCID₅₀ (« 50% *tissue culture infective dose* ») de la souche SIVmac₂₅₁ alors que 50 AID₅₀ ont été utilisés pour nos études.

A J3pi, la charge virale ADN est sporadiquement détectée dans les différents échantillons testés, à hauteur de 1 à 10 copies d'ADN viral pour 100 000 cellules. Le fait que le provirus ne soit pas détecté dans tous les échantillons prélevés à partir d'un même organe signifie que l'infection d'un organe débute de manière localisée avant de se disséminer, comme le prouvent les données d'immunomarquage (Ribeiro dos Santos et al., 2011).

Les deux animaux sacrifiés au jour 7pi montre une charge ADN détectable dans l'iléon et chaque morceau testé est positif. En revanche, à J7pi dans les autres segments intestinaux l'ADN viral n'est pas détecté chez tous les singes, suggérant (i) une variabilité inter-animaux et peut-être (ii) une dissémination plus rapide du virus dans l'iléon. A J14pi, la détection de la charge ADN s'homogénéise à tous les segments pour atteindre en moyenne 10 000 copies d'ADN viral pour 100 000 cellules. De plus, il est important de noter que ces quantifications furent effectuées sur des morceaux d'organes, sans purification préalable des cellules infectables. Cependant, la majorité des cellules de la muqueuse intestinale sont plus probablement des cellules stromales CD4⁻ ne pouvant probablement pas être infectées. La charge virale ADN par cellule susceptible à l'infection est donc au moins d'un ordre de grandeur plus élevée sur notre estimation sur tissus entiers.

Nos résultats suggèrent donc soit que toutes les cellules CD4⁺ de la muqueuse intestinales sont infectées au cours des deux premières semaines de l'infection SIV, soit, plus

probablement qu'une minorité de ces cellules est infectée mais contient de nombreuses séquences d'ADN viral par cellule. En effet, la multi-infection des lymphocytes T CD4⁺ pu être mis en évidence dans la rate des patients infectés par le VIH-1 (Gratton, Cheynier, Dumaourier, Oksenhendler, & Wain-Hobson, 2000), (A. Jung et al., 2002).

Jung et collègues rapportent en effet que chaque lymphocyte T infecté dans cet organe contiendrait environ 3 à 4 copies de provirus intégré (A. Jung et al., 2002) tandis que l'analyse de la diversité génétique du VIH dans les mêmes prélèvements suggèrerai au moins 10 copies d'ADN viral, intégré ou non, par cellule infectée (Gratton et al., 2000).

Au laboratoire, nous avons choisi de rapporter la quantité d'ARNm cibles à la quantité de transcrits du gène de ménage HPRT puisque ce gène est exprimé constitutivement et à faible niveau, autorisant la quantification d'ARNm cibles faiblement ou rarement exprimés (Foss, Baarsch, & Murtaugh, 1998). Connaissant la quantité absolue d'ARN HPRT par cellule (estimée à 1 à 10 molécules par cellule, (Steen, Luthman, Hellgren, & Lambert, 1990), nous pouvons estimer qu'un taux d'infection de 1 molécule d'ARN SIV pour 1 copie d'HPRT correspond à 1 à 10 copie d'ARN viral par cellule. Cependant, en considérant que les cellules CD4⁺ représentent moins de 10% de la surface totale de la lamina propria (figure 3 de l'étude N°1), nous pouvons donc estimer que les cellules infectées contiennent au minimum 10 à 100 copies d'ARN viral dans l'iléon des singes au jour 14 d'infection. Couplées aux données d'hybridation *in situ*, ces données sont également en faveur de la multi-infection de peu de cellules fortement productives. Cependant, il est aussi possible que des cellules non T (par exemple les macrophages CD4⁺ CCR5⁺ de la muqueuse iléale) soient également infectées et produisent également du virus, à des taux plus faibles, donc indétectables par les méthodes *in situ*.

Dans la muqueuse rectale et colique, la détection des cellules productivement infectées par hybridation *in situ* en phase aigue d'infection SIV chez le macaque rhésus ne montre en effet que quelques cellules fortement positives (Q. Li et al., 2005), (Couëdel-Courteille et al., 2003). Toutefois, le seuil de détection de cette technique est trop élevé pour autoriser la détection de quelques copies d'ARN du SIV par cellule (Nicol & Nuovo, 2005).

Ces observations n'excluent donc pas l'hypothèse selon laquelle de nombreuses cellules infectées seraient silencieuses pendant la phase aigue de l'infection dans la muqueuse intestinale (parmi lesquelles se trouvent certainement des macrophages) et seuls certains

lymphocytes T CD4⁺ activés alimenteraient alors de façon conséquente la multiplication du virus.

A J10pi, nous montrons que l'iléon est le siège d'une réplication virale plus précoce que le jéjunum et le colon ascendant où l'ARN viral n'est pas détecté. Le duodénum semble également être infecté productivement mais de façon légèrement moins conséquente que l'iléon (valeurs médianes à 0,9 et 1,2 copies d'ARNm SIV/copie d'ARNm HPRT respectivement). Il est clairement établi que le tractus intestinal est une cible précoce majoritaire de la réplication virale chez les animaux d'origine indienne (Veazey, 1998), (Mattapallil et al., 2005).

Mais l'hypothèse d'une atteinte privilégiée d'une partie ou d'une autre du tractus intestinal les jours suivant l'infection n'est pas vérifiée à l'heure actuelle. Pourtant, cette question revêt toute son importance pour l'étude de la réponse immune muqueuse qui suit la contamination par le VIH. Une étude menée sur des macaques en phase chronique d'infection montre une atteinte plus conséquente de l'infection SIV sur les lymphocytes T de l'intestin grêle comparé au colon (Schultheiss & Stahl-Hennig, 2011). Chez les patients traités en phase chronique, le niveau d'infection n'est pas homogène le long de l'intestin et serait plus important au niveau de l'iléon que dans le colon (Yukl et al., 2010).

De façon cohérente, nos résultats laissent penser que l'intestin grêle est une cible privilégiée de la réplication virale dès la phase aiguë de l'infection. Ceci suggère que l'hétérogénéité de l'infection de la muqueuse intestinale serait établie dès les premiers jours qui suivent la contamination par les virus de l'immunodéficience. Ces résultats sont d'une grande importance pour l'étude des stratégies thérapeutiques visant à limiter le plus tôt possible la taille des réservoirs viraux dans l'intestin des patients (Ananworanich et al., 2012).

L'hétérogénéité d'infection des muqueuses intestinales pourrait être la conséquence (i) d'une plus grande proportion de lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ et/ou exprimant CXCR4⁺ dans l'intestin grêle des animaux sains et/ou (ii) d'une plus intense prolifération de ces cellules dès

les premiers jours suivant l'infection, alimentant la réplication virale ou bien encore (iii) d'un recrutement rapide et ciblé de lymphocytes T CD4⁺ par cette muqueuse après infection.

Il est bien établi que les lymphocytes T CD4⁺ de la lamina propria de l'intestin sont en grande majorité de phénotype mémoire et caractérisés par l'expression de CCR5 (Meng et al., 2000) (jéjunum), (Veazey et al., 2000). Mais, d'après mes connaissances, aucune étude n'a permis de conclure quant à une proportion différente du nombre de ces cellules dans la muqueuse de l'intestin grêle par rapport au colon. Puisqu'elles sont les cibles privilégiées de l'infection par le SIV et le VIH-1, il semble crucial de mieux connaître la répartition de ces cellules à travers le tractus gastro-intestinal.

L'iléon est le siège d'une réplication virale plus précoce et importante que les autres parties de l'intestin. L'iléon se distingue par le fait qu'il contient de nombreuses plaques de Peyer, en particulier à sa partie distale. Le jour de l'autopsie, cet organe a été échantillonné de telle sorte que tout l'iléon soit représenté. Il est improbable que les morceaux utilisés pour quantifier l'ADN et l'ARN viral ne proviennent que de la partie distale étant donné le nombre d'échantillons utilisés (4 morceaux par singe).

Il existe très peu de recherches sur l'infection des plaques de Peyer par les SIV et VIH. Mais il est établi que les cellules T activées productivement infectées sont localisées plutôt dans la lamina propria et moins dans les tissus lymphoïdes organisés au cours de l'infection aiguë par le SIV (Sasseville et al., 1996), (Q. Li et al., 2005) et le VIH-1 (Mehandru, 2004). Il est donc probable que les séquences virales que nous détectons dans les différentes parties de l'intestin proviennent majoritairement de la lamina propria, la présence de follicules lymphoïdes dans un échantillon aurait alors pour conséquence de diminuer la charge virale ADN estimée par cellule. En effet, la densité cellulaire dans les follicules lymphoïdes est bien supérieure à celle des autres zones de l'intestin.

Enfin, nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité de l'infection du tractus intestinal les premiers jours après transmission du virus impliquerait peut-être des perturbations du trafic lymphocytaire vers cette muqueuse.

III. L'infection aiguë par le SIV induit une lymphopénie périphérique transitoire

A. Rôle de la lymphopénie dans la pathogenèse de l'infection

L'analyse des compartiments lymphocytaires T CD4 et CD8 dans la circulation sanguine des macaques rhésus chinois nous a permis de confirmer l'établissement d'une lymphopénie transitoire, débutant dès les premiers jours de l'infection, avec un pic de déplétion au jour 10. Chez le macaque rhésus indien, il est bien établi qu'une déplétion consécutive des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ du sang survient les premiers jours après infection SIV (Mattapallil, Letvin, & Roederer, 2004), (Gill, Ahsan, Lackner, & Veazey, 2012). De façon importante, dans ce modèle plus pathogène, seul le compartiment lymphocytaire T CD8⁺ montre un rebond alors que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ continue de diminuer jusqu'au décès des singes d'origine indienne.

Au contraire, nos résultats confirment sur un grand nombre de macaques rhésus chinois suivis longitudinalement l'observation de J. Estaquier et collègues qui montrent que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ connaît lui aussi un rebond à la fin de la phase aiguë du macaque rhésus chinois (Estaquier et al., 2000). Cette étude a notamment montré la corrélation entre le nadir de lymphopénie et le pic de virémie sanguine. Ainsi, il est possible que l'absence de rebond des lymphocytes T CD4⁺ circulants soit associée à la virémie plus élevée au pic de charge virale chez les animaux d'origine indienne infectés par le SIVmac. Cette déplétion transitoire des compartiments lymphocytaires T CD4 et T CD8 pourrait donc être impliquée dans la pathogenèse de l'infection (Pitcher et al., 1999), (Schmitz, 1999), (Ortiz et al., 2011). Cette dernière étude lie directement les lymphocytes T CD4⁺ au contrôle de la virémie en phase aiguë d'infection puisque leur déplétion expérimentale avant l'infection SIV dans le modèle macaque rhésus indien abroge le déclin de la charge virale après le pic de virémie. Pourtant, chez l'Homme, il semblerait que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs spécifiques du VIH soient préférentiellement infectés en primo-infection, aboutissant à la perte partielle du contrôle de l'infection. (Douek et al., 2002)

Par ailleurs, le pic de réplication virale qui a pu être décrit chez l'Homme infecté par le VIH-1 est plus proche de celui des animaux d'origine chinoise infectés par le SIVmac₂₅₁ (Ling, Veazey, Penedo, et al., 2002b), (Y. Zhou et al., 2013). Nous pouvons donc imaginer que l'infection aiguë par le VIH-1 se caractérise également par une lymphopénie transitoire des deux compartiments CD4 et CD8 chez l'Homme. Plus tard après le rebond, à deux mois post-infection, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est similaire chez l'Homme et le macaque rhésus chinois, contrairement à ce qui est observé dans les modèles plus pathogènes (Ling, Veazey, Penedo, et al., 2002b).

Tous ces résultats laissent penser que la lymphopénie précoce induite par le virus constitue un mécanisme de détournement du système immunitaire, favorisant la réplication virale rapide et aboutissant à établir les réservoirs. Néanmoins, le déclin précoce des lymphocytes T périphériques a également été rapporté chez des macaques rhésus infectés par un mutant non pathogène de SIVmac₂₃₉ (Iida et al., 1999). En conséquence, il est possible que ces changements périphériques soient associés à la réplication virale plutôt qu'à la pathogenèse de l'infection.

Une lymphopénie transitoire touchant différents types cellulaires est également observée dans d'autres infections virales chez l'Homme et l'animal telles que la fièvre de Lassa endémique en Afrique de l'Ouest (Baize et al., 2009), le virus respiratoire syncytial (RSV pour « Respiratory Syncytial Virus ») responsable de la majorité des infections respiratoires de l'enfant (ROE et al., 2004), le virus de la Dengue retrouvé en Asie et en Amérique du Sud (Fadilah et al., 1999) ou bien encore le virus du Nil Occidental (ou virus West-Nile) (Cunha, Minnaganti, Johnson, & Klein, 2000). L'infection aiguë par le virus de la fièvre aphteuse (FMDV pour « Foot and Mouth Disease Virus ») se caractérise également par une lymphopénie rapide et transitoire des compartiments lymphocytaires T CD4 et CD8 (Díaz-San Segundo et al., 2006).

Ceci laisse penser que toute infection virale a des répercussions rapides sur le nombre de cellules en périphérie. La déplétion initiale des cellules périphériques peut refléter le fait que le virus mobilise le système immunitaire périphérique dans les organes lymphoïdes et les sites de réplication virale.

B. L'infection aiguë par le SIVmac induit une perturbation de la fonction thymique et du trafic lymphocytaire

Si nombre d'infections virales induisent une lymphopénie, il existe peu d'évidences quant aux mécanismes associés et au rôle de celle-ci. Cependant, on peut penser que la mobilisation des cellules du système immunitaire est probablement la conséquence de modifications de la production des chimiokines dans les organes, induites par des signaux de danger produits en réponse à l'infection. En effet, chez la souris invalidée pour les récepteurs aux chimiokines CCR2 et CCR1 et infectée par la dengue, la létalité et l'atteinte des organes est moins sévère que chez les souris sauvages infectées, suggérant un rôle délétère du trafic lymphocytaire dans la pathogénèse de l'infection virale (Guabiraba et al., 2010).

La lymphopénie périphérique que nous observons au cours de l'infection SIV aiguë soulève plusieurs hypothèses et peut impliquer :

- l'apoptose des cellules circulantes directement ou indirectement médiée par le virus,
- une perturbation précoce du turnover de ces cellules, liée à un changement de production des précurseurs lymphocytaires par la moelle osseuse ou une modification de la fonction thymique
- une redistribution cellulaire vers les organes lymphoïdes et les autres tissus.

Le fait que les lymphocytes T cytotoxiques disparaissent également de la circulation exclue l'hypothèse exclusive d'une mort cellulaire massive. De plus, l'étude de l'apoptose pendant la phase aiguë de l'infection SIV a montré qu'elle ne suffit pas à induire un tel déclin des cellules circulantes (Iida et al., 1999).

Pour aller plus loin dans la compréhension de cette lymphopénie, nous avons dénombré les cellules circulantes dans les différentes sous-populations lymphocytaires T naïves, centrales mémoires et effectrices mémoires. Nous rapportons le déclin significatif de toutes les sous-populations lymphocytaires T CD4 et CD8 à partir du jour 3 pi. Au jour 14, les compartiments T naïfs CD4 et CD8 montrent un rebond du nombre de cellules vers des valeurs basales. A J14pi, la perte des compartiments lymphocytaires T mémoires CD4 continue tandis que les lymphocytes T mémoires CD8 observent un rebond important.

Le rebond du nombre de lymphocytes T dans la circulation sanguine touchant les compartiments naïfs, il est probable que l'infection virale affecte l'hématopoïèse. C'est le cas *in vivo* chez la souris BLT infectée par le VIH-1 (Nixon et al., 2013). Chez le macaque infecté chroniquement, le caractère multipotent et clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ semble perdu (Thiebot et al., 2005). De façon intrigante, cet effet serait médié par la protéine virale nef *in vivo* (Prost et al., 2008). L'impact sur les cellules CD34⁺ dès les premiers jours suivant l'infection n'est cependant pas encore testé à ma connaissance, nous ne pouvons donc pas exclure cette possibilité.

Dans l'étude n°2, nous avons démontré *in vivo* que le thymus du macaque est infecté dès la phase aiguë de l'infection. De plus, il a été rapporté que cet organe involue dès 8 semaines pi chez le macaque rhésus indien (Baskin et al., 1991). Chez l'homme, l'inhibition de la fonction thymique est observée au cours des 3 premiers mois d'infection (Dion et al., 2004). Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de l'infection sur l'expression des chimiokines par le thymus. Chez la souris, les chimiokines agissent en synergie de façon finement régulée pour promouvoir la maturation des thymocytes. CCL25 et CCL19 sont impliquées dans la colonisation du thymus, CXCL12 est requise dans la zone sous-capsulaire, CCL19 et CCL21 participent à l'export thymocytes matures vers la circulation sanguine (Bleul & Boehm, 2000), (Schwarz et al., 2007), (Zlotoff et al., 2010).

Nous avons mis en évidence que ces chimiokines sont également retrouvées dans les mêmes compartiments thymiques chez des macaques rhésus sains (CCL25 dans le cortex, CCL19 et CCL21 dans la médulla et CXCL12 dans la zone sous-capsulaire). Dès J3pi, l'évolution de l'expression des chimiokines (augmentation de CCL25 et CCL19 et diminution de CXCL12 dès J3pi) va dans le sens d'un trafic accéléré des thymocytes : la surexpression de CCL25 induirait une migration plus rapide des précurseurs T dans le cortex, de la jonction cortico-médullaire vers la zone sous-capsulaire où leur rétention par CXCL12 serait diminué. L'augmentation de l'expression de CCL19 signerait une circulation plus rapide à travers la médulla permettant un export plus rapide vers la périphérie. Toutefois, des recherches plus poussées sont requises pour confirmer l'établissement d'un gradient plus important de ces chimiokines, ce processus pouvant être régulé très finement, par exemple via la séquestration du ligand par son/ses récepteur(s) atypique(s) (Ulvmar et al., 2014).

Dans un second temps, nous avons mesuré la fonction thymique par la quantification des TREC. Nous montrons que le rapport sj/ β TREC diminue après infection, signant le remplacement des RTE par des cellules nouvellement produites et présentant un passé de prolifération intrathymique réduite. Pour obtenir ce changement de rapport sj/ β TREC, il est impératif (i) que les cellules naïves préexistantes quittent la circulation sanguine et (ii) que de nouvelles cellules ayant peu proliféré pendant leur maturation dans le thymus soient produites et combler le compartiment circulant. Le fait que, à J14, le rapport sj/ β TREC retrouve son niveau initial lors du rebond du nombre de RTE circulantes indique que l'export thymique au cours des premiers jours de l'infection ne représente qu'une fraction des RTE de l'organisme et que les RTE produites pré-infection retournent dans la circulation sanguine après leur séquestration initiale dans les tissus.

Le rebond des lymphocytes T cytotoxiques à J14pi juste avant le déclin de la virémie est peut-être le reflet d'une prolifération des cellules cytotoxiques spécifiques du virus (Ogg, 1998), (Schmitz, 1999). En revanche, l'absence de rebond des compartiments T CD4⁺ mémoires pourrait être la conséquence de leur plus grande susceptibilité à l'infection (van Noesel et al., 1990), (Schnittman et al., 1990) et/ou leur rétention dans les tissus. De façon consistante avec la seconde option, chez les patients sous HAART, l'augmentation initiale (au cours des premiers mois après initiation de la thérapie) du nombre de lymphocytes T CD4⁺ est probablement le résultat d'une redistribution de ces cellules à partir des tissus vers la circulation sanguine (Hazenberget al., 2002).

La rapidité de la reconstitution touchant les sous-populations naïves, le fait que les compartiments CD8 mémoires reviennent également aux niveaux de base dès J14pi ainsi que l'ampleur du rebond en nombre de cellules excluent l'implication exclusive d'une production thymique accélérée pour le retour à l'homéostasie périphérique, suggérant également une recirculation des cellules des organes vers la périphérie.

Des études visant à déterminer l'impact de l'infection sur le nombre de lymphocytes T mémoires circulantes exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et les récepteurs CCR6 et CCR9 impliqués dans le homing vers l'intestin sont actuellement en cours au laboratoire. Les résultats devraient déterminer si le trafic de ces cellules vers la muqueuse intestinale est impacté au cours de l'infection aiguë par le SIVmac chez les macaques rhésus chinois. Les lymphocytes T mémoires circulantes $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$ sont majoritairement de type Th17 et

seraient préférentiellement infectées par le SIV (Kader, Wang, Piatak, Lifson, Roederer, Veazey, et al., 2009b). Les cellules T CD4⁺ CCR6⁺ ont également été décrites comme étant hautement permissives à l'infection par le VIH-1 (Gosselin et al., 2010), (Monteiro et al., 2011). Par conséquent, le recrutement de ces cellules à la muqueuse intestinale aurait pour conséquence de nourrir la réplication virale et contribuerait à l'établissement des réservoirs. Dans ce contexte, nous avons également analysé l'expression des chimiokines dans l'intestin et en particulier dans l'iléon.

IV. Conséquences de l'infection de l'iléon sur l'expression des chimiokines

A. Impact de l'infection de la muqueuse

Il devient de plus en clair que le VIH-1 a développé des stratégies multiples pour assurer la maintenance d'un pool tissulaire de cellules susceptibles à l'infection alimentant la réplication virale. De nombreuses publications démontrent en effet que l'infection chronique par le VIH-1 et le SIV aboutit à un remodelage de l'environnement chimiotactique dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (pour revue, (Reinhart, 2003)). Mes résultats de doctorat permettent d'envisager un impact du trafic lymphocytaire sur la pathogénèse dès la phase aiguë de l'infection par le SIVmac. Nous montrons que l'expression de nombreuses chimiokines augmente dans l'iléon les jours suivants l'infection par le SIV. En particulier, nous avons noté une augmentation significative des chimiokines CCL5, CCL19 et CCL25.

La chimiokine CCL5 (RANTES) est sécrétée notamment par les lymphocytes T cytotoxiques activés et pourrait être impliquée dans l'inhibition de l'entrée du virus via sa fixation au corécepteur CCR5 (Cocchi et al., 1995), (Mosier et al., 1999). Il a en effet été montré *ex vivo* dans des modèles de tissus humains infectés que l'apport exogène de CCL3, CCL4 et CCL5 (ligands de CCR5) réduirait la réplication des souches virales R5-tropiques (Margolis, Glushakova, Grivel, & Murphy, 1998). L'étude des cohortes de professionnelles du sexe fortement exposées au VIH-1 a révélé une augmentation de l'expression de CCL5 dans la muqueuse vaginale des femmes exposées mais non infectées, en plus d'un nombre de lymphocytes T CD4⁺ augmenté par rapport aux femmes infectées chroniquement ou non exposées (Iqbal et al., 2005). De façon concordante, chez le macaque rhésus infecté par le SIV, l'augmentation induite de l'expression des ligands de CCR5 est corrélée inversement avec la charge virale plasmatique (Lehner et al., 2000).

De façon cohérente avec nos résultats, une étude démontre une augmentation de l'expression génique de CCL5 dans le jéjunum de macaque rhésus en phase aiguë d'infection par le SIVmac (Ndolo, 1999). De façon surprenante, dans cette étude l'intensité de l'augmentation de l'expression de RANTES corrèle avec la pathogénicité du virus et non avec un blocage de la réplication virale. Enfin, l'infection *ex vivo* d'explants de prépuce humain n'est pas inhibée mais exacerbée par des niveaux élevés de CCL5, recrutant les cellules nécessaires à la réplication virale dans la zone sous épithéliale (Z. Zhou et al., 2011).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de CCL5 pourrait avoir des effets délétères, probablement via l'attraction des cellules cibles de la réplication virale. Il serait donc intéressant de comparer nos résultats avec l'expression de CCL5 dans la muqueuse des singes d'origine indienne en utilisant la même méthode de quantification, afin d'examiner les variations potentielles de l'expression de RANTES dès la phase aiguë dans ce modèle plus pathogène.

CCL19 (MIP-3 β , ELC) agit en gradient pour le recrutement des cellules T et des cellules dendritiques CCR7⁺ dans les zones T des ganglions lymphatiques. L'expression de CCL19 et CCL21 par la muqueuse intestinale saine et au cours de l'infection par le SIV et le VIH-1 n'est que très rarement documentée. CCL19 et CCL21 sont très probablement produites au niveau des follicules lymphoïdes isolés de la muqueuse (Willmann et al., 1998). Nos résultats rapportent une augmentation significative du nombre de transcrits codant CCL19 dans la muqueuse iléale à J10pi. De façon intéressante, l'expression de CCL21 (6Ckine, SLC) demeure stable dans l'iléon jusqu'à J14pi.

Nous avons mis en évidence que l'expression de CCL21 dans le thymus infectée est également inchangée alors que la concentration de transcrits codant CCL19 est augmentée. Ces données suggèrent des mécanismes différents de régulation de l'expression de ces chimiokines. La majorité de nos connaissances concernant l'expression de CCL19 et CCL21 est issue d'études sur les ganglions lymphatiques périphériques. Chez la souris, il est montré que CCL21 est régulée différemment dans les tissus extra-lymphoïdes (Lo et al., 2003) En outre, il est bien établi chez la souris que CCL21 est constitutivement exprimée par les cellules endothéliales des HEV des ganglions alors que cette chimiokine ne semble pas synthétisée par les HEV chez l'Homme où elle est détectée uniquement sous forme protéique (Carlsen et al., 2005).

Bien que son expression ait initialement été identifiée dans le thymus, CCL25 (TECK) est largement décrite dans le homing des lymphocytes T activés CCR9⁺ à la muqueuse intestinale. Chez les patients sous traitement, l'expression de CCL25 dans le jéjunum est réduite, induisant probablement un défaut de migration des lymphocytes T CD4⁺ CCR9⁺ α4β7⁺ (Mavigner et al., 2012). Ces données expliqueraient le défaut de reconstitution du nombre de LPL Th17 caractéristique des infections pathogènes (Brenchley et al., 2008). Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression de cette chimiokine à J10pi, suggérant au contraire une migration accrue des lymphocytes T CCR9⁺ vers l'iléon au cours de l'infection aiguë par le SIVmac. De façon intéressante, les monocytes/macrophages circulants exprimeraient également CCR9 chez l'Homme (Schmutz et al., 2010), suggérant une action de CCL25 également sur la lignée myéloïde.

Le pic d'augmentation de ces chimiokines à J10pi est corrélé au nadir du nombre de lymphocytes T périphériques. Par conséquent, mes travaux suggèrent que l'infection aiguë de l'intestin grêle par le SIV pourrait induire la redistribution des lymphocytes T CCR7⁺ (CCL19), CCR1⁺, CCR2⁺, CCR3⁺, CCR5⁺, CCR4⁺ (CCL5) et CCR9⁺ (CCL25) à la muqueuse iléale. Une tendance à l'augmentation est notée à J10pi également pour CCL20 qui attire les cellules T CCR6⁺. Des quantifications supplémentaires sont requises afin de pouvoir déterminer si une modification significative de ces chimiokines survient également dans le duodénum et le jéjunum. Par ailleurs, de nombreux types cellulaires expriment également ces récepteurs. C'est le cas par exemple des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Par conséquent, l'infection aiguë par le SIV aurait également un impact sur la circulation de ces APC.

De façon surprenante, nous observons un déclin significatif de l'expression de toutes ces chimiokines au jour 14pi. Cette diminution de la quantité de transcrits peut refléter la dégradation de l'ARNm, souvent rapporté comme étant instable (Marçais et al., 2006), (R. Biswas et al., 2003) ou un arrêt de la transcription. Ce déclin coïncide avec le rebond du nombre de lymphocytes T périphériques. Ainsi, ce rebond est peut-être la conséquence d'une recirculation des cellules préalablement retenues dans les tissus intestinaux. Nos résultats laissent penser que l'infection par le SIV induirait d'importants mouvements de cellules immunitaires de la circulation vers les organes puis inversement. Ces mouvements auraient pour conséquence la dispersion systémique des cellules infectées et l'établissement des réservoirs viraux. Ils pourraient également participer à la mise en place d'une réponse immunitaire dans les organes infectés les premiers jours après la contamination.

Par conséquent, des stratégies visant à inhiber le trafic ciblé des cellules infectées pourraient s'avérer judicieuses. Cependant, l'attraction des cellules du système immunitaire aux sites d'infection pourrait également participer à la mise en place d'une réponse immunitaire dans les organes infectés les premiers jours après la contamination. Leur abrogation serait alors délétère.

B. Impact de l'infection des ganglions sur l'expression des chimiokines

Nous démontrons que la réplication virale à J10pi est plus importante dans les ganglions mésentériques drainant la muqueuse intestinale que dans les ganglions axillaires. Ces dernières données suggèrent qu'après inoculation du SIV par voie systémique, les ganglions mésentériques sont productivement infectés avant que le virus ne se propage aux ganglions axillaires. Cela avait été montré précédemment chez le macaque rhésus chinois infecté par voie rectale (Ribeiro dos Santos et al., 2011). Les ganglions mésentériques représenteraient un réservoir viral majeur, au même titre que la muqueuse intestinale (Cumont et al., 2007).

Dans les ganglions axillaires et mésentériques, l'expression de CCL19 et CCL21 reste inchangée les 14 premiers jours post-infection. Seule l'expression de CCL5 augmente au cours du temps post-infection (voir résultats supplémentaires II.D.3). Ces résultats dénotent peut-être une modification plus profonde du pattern d'expression des chimiokines dans la muqueuse intestinale par rapport aux ganglions et sont en faveur de migrations lymphocytaires vers la muqueuse intestinale.

Pour mieux comprendre ces migrations, Clay et collègues ont isolé les lymphocytes T de la circulation sanguine de macaques rhésus en phase aiguë d'infection par le SIV puis les ont marqué au CFSE en tant que traceur fluorescent. Après transfert autologue, ils observent une accumulation de ces lymphocytes T marqués dans la muqueuse de l'intestin grêle et non dans les ganglions axillaires ni mésentériques (Clay, Rodrigues, Harvey, Leutenegger, & Esser, 2005).

La transcription de CXCL10 existe à faible niveau dans les organes des animaux sains et est induite au cours de l'infection aiguë par le SIV, atteignant un maximum d'expression à J10pi. Par ailleurs, il a été montré que la quantité de CXCL10 dans la muqueuse vaginale reflète l'inflammation et la charge virale locale des patientes en phase chronique d'infection (Blish et al., 2012). Il serait intéressant de mesurer l'expression de CXCL10 dans la

muqueuse intestinale après J14pi afin de voir si son niveau d'expression y reflète également un état d'inflammation maintenu. La réduction de l'inflammation via l'inhibition de CXCL10 connaît un succès pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Yellin et al., 2012) et pourrait peut-être bénéficier aux patients infectés par le VIH-1.

Il convient de noter que nos résultats montrent une modification de l'expression des chimiokines au niveau de la production d'ARN messagers. Cependant, l'expression des chimiokines est fortement régulée non seulement au niveau transcriptionnel mais elle est également soumise à de fortes régulations post-traductionnelles. Il semble donc important de poursuivre ces travaux par la détection des protéines dans le tissu intestinal. Récemment, une méthode sensible de détection des cytokines et chimiokines à partir de biopsies mucoales humaines a été mise au point (Staples, Ingram, Atherton, & Robinson, 2013). Malheureusement, le manque d'anticorps reconnaissant les chimiokines chez le macaque rhésus disponibles actuellement limite l'applicabilité de cette technique à notre modèle d'étude. Dans le but de localiser les cellules productrices de chimiokines dans la muqueuse intestinale, une méthode d'hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques du macaque rhésus a été mise au point au laboratoire pour outrepasser cet obstacle. Tandis que l'écrasante majorité des travaux sur l'expression des chimiokines dans les organes provient du modèle murin, la détection *in situ* de l'ARNm nous offrirait l'avantage de localiser les cellules productrices des chimiokines dans les tissus des PNH avant et après infection.

V. Préservation du nombre de LPL CD4⁺ dans l'iléon des macaques rhésus chinois en phase aiguë d'infection par le SIVmac

La plupart des études visant à analyser la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ dans le tractus gastro-intestinal en primo-infection se basent sur des analyses en cytométrie de flux après dissociation tissulaire. Plus rarement, des comptages sont réalisés *in situ* sur des champs microscopiques représentatifs (Veazey, 1998), (Mehandru, 2004). Chez l'Homme, Brenchley et collègues rapportent l'impossibilité d'estimer fidèlement le nombre de LPL CD4⁺ à partir de biopsies (Brenchley, 2004). Par conséquent, la réduction de la fréquence de lymphocytes T CD4⁺ parmi les LPL au cours de l'infection aiguë par le SIV est bien documentée mais l'estimation du nombre absolu de ces cellules reste à clarifier.

Nous nous sommes tout d'abord assurés que les animaux étaient comparables entre eux en terme d'évolution de l'infection en mesurant l'évolution de leur charge virale et les taux de lymphocytes T CD4⁺ sanguins. Pour ces paramètres mesurables en périphérie, tous les singes montrent un profil évolutif similaire au cours de l'infection aiguë. Néanmoins, étant donné les faibles effectifs d'animaux euthanasiés à chaque temps pi au cours de l'infection aiguë, il conviendrait de poursuivre cette étude en augmentant ces effectifs. Une étude similaire mais réalisée en suivi longitudinal d'un nombre suffisant d'animaux prélevés par endoscopie digestive, bien que lourde, pourrait être envisageable et nous permettrait de nous affranchir des potentielles variations inter-animaux. Toutefois, le nombre et le volume des biopsies nécessaires à l'analyse quantitative des populations cellulaires ainsi que la fréquence des prélèvements risquent de ne pas être sans conséquence non seulement sur le bien-être et la santé des animaux (anesthésies répétées, prélèvements entraînant des saignements) mais aussi sur l'évolution de l'infection elle-même dans le tractus intestinal et dans le reste de l'organisme.

Pour vérifier notre hypothèse selon laquelle la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ intestinaux serait moins sévère chez le macaque rhésus chinois et consistante avec le développement de la pathologie, nous avons développé une méthode digitale de quantification du marquage fluorescent à partir de photographies reflétant une surface de 25mm² de tissu.

Cette méthode nous a permis de quantifier la surface occupée par le simple marquage, soit CD3, soit CD4, soit CD8 ainsi que la surface occupée par les pixels doublement marqués CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺. Ces données rapportées à la surface moyenne d'un lymphocyte nous permettent d'estimer le nombre de LPL marquées par unité de surface (voir matériel et méthodes, chapitre B et les résultats supplémentaires II.D.2).

Nous rapportons que la surface occupée par le marquage CD3 augmente au cours du temps post-infection et reste élevée même chez le singe en SIDA. Cette augmentation est certainement due à l'augmentation du nombre de cellules T CD8⁺ tandis que la surface occupée par le marquage CD3⁺ CD4⁺ n'est pas modifiée au cours des deux premières semaines post-infection. Pour aller plus loin, nous avons testé deux animaux sacrifiés en stade chronique de la pathologie (J65pi) ainsi qu'un macaque en SIDA. Nous montrons que le nombre de LPL CD8⁺ demeure plus élevé chez ces singes que chez les contrôles. A J65pi, le nombre de LPL CD4⁺ reste stable alors qu'il diminue de manière significative au stade SIDA.

Il est bien établi que la phase aiguë de l'infection se caractérise par une infiltration de la lamina propria par des cellules effectrices cytotoxiques (Mattapallil et al., 2005). En phase chronique, la présence de cellules cytotoxiques spécifiques du SIV dans la muqueuse intestinale serait hétérogène et corrélée à une préservation de la population CD4 (Schultheiss & Stahl-Hennig, 2011). Ainsi, l'absence de déplétion des LPL CD4⁺ à J65pi pourrait refléter (i) une meilleure réponse cytotoxique spécifique locale ou (ii) une restauration du pool de lymphocytes T CD4⁺ entre J14 et J65pi. Dans une étude réalisée en 2007 sur 12 macaques rhésus chinois infectés par le clone moléculaire SIVmac₂₃₉, Ling et collègues rapportent que la progression plus lente de la pathologie impliquerait la restauration (à 6 mois post-infection) du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans l'intestin (Ling et al., 2007).

L'absence de déplétion des LPL CD4⁺ dans l'iléon concomitante à une réplication virale intense les deux premières semaines post-infection SIV soulève d'autres questions. Existe-t-il un défaut d'apoptose qui expliquerait la préservation du nombre de ces cellules ? Les LPL CD4⁺ CCR5⁺ infectées sont-ils lysés mais remplacées par l'arrivée massive de lymphocytes T CD4⁺ circulants (Ling et al., 2007) ?

Nos résultats concernant la lymphopénie des compartiments T CD4 et CD8 en parallèle de l'augmentation de l'expression des chimiokines dans la muqueuse iléale les dix premiers jours pi apportent des éléments de réponse concernant le recrutement possible des cellules circulantes. Mieux comprendre l'impact du trafic lymphocytaire vers l'intestin les premiers jours après infection est d'une grande importance puisque l'arrivée de nouvelles cellules cibles pourrait alimenter la réplication virale. De façon cohérente, le blocage de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ juste avant et pendant l'infection aiguë SIV réduit la charge virale dans la muqueuse jéjunale et rectale chez les macaques rhésus indiens (Ansari et al., 2011). Ces résultats prouvent de façon indirecte qu'un homing des lymphocytes T exprimant $\alpha 4\beta 7$ alimente la réplication virale locale dans l'intestin. L'arrivée massive de cellules circulantes CD3⁺ CD4⁺ dans l'intestin devrait coïncider avec une augmentation locale du nombre de ces cellules, à moins que l'immense surface muqueuse ne dilue ce phénomène. En effet, les lymphocytes T circulants ne représentent qu'une toute petite fraction des lymphocytes T totaux de l'organisme (environ 2%, (Trepel, 1974), (Ganusov & De Boer, 2007)) et leur arrivée ne devrait donc pas changer magistralement le nombre de LPL dans l'iléon. Par conséquent, l'augmentation des lymphocytes T CD8⁺ dans la lamina propria est probablement la résultante du recrutement de ces cellules additionnée d'une prolifération intense.

Une autre explication serait une repopulation de la muqueuse en parallèle d'une apoptose modérée. Mes travaux de doctorat suggèrent qu'une préservation des LPL CD4⁺ serait associée à la plus progression plus lente de la pathologie chez les macaques rhésus chinois alors que jusque 90% des LPL CD4 sont déplétés chez les animaux d'origine indienne (Kewenig et al., 1999). De façon consistante, les LPL CD4⁺ (y compris les Th17) sont intactes dans la muqueuse intestinale des patients LTNP (Ciccone et al., 2011). Deux études menées sur 9 macaques rhésus chinois se sont penchées sur la relation entre le niveau d'apoptose tissulaire pendant la phase aiguë et la progression de la pathologie. Les auteurs démontrent que le niveau d'apoptose dans la zone T des ganglions périphériques est beaucoup plus conséquent chez les animaux qui progressent plus vite (Monceaux et al., 2003), (Viollet et al., 2006). Par conséquent l'apoptose extensive des lymphocytes T CD4⁺ dans les organes des macaques rhésus indiens pendant l'infection aiguë pourrait expliquer un moins bon contrôle de la virémie et une progression plus rapide vers le SIDA.

L'absence de déplétion des LPL CD4⁺ semble donc être corrélée à une progression plus lente de la pathologie après infection des macaques rhésus chinois par le SIVmac₂₅₁. Cette hypothèse est confortée par les différences immunologiques et virologiques observées chez les deux sous-espèces de macaque rhésus. Comme nous l'avons vu, la diminution des lymphocytes T CD4⁺ périphérique chez les singes d'origine chinoise est transitoire puis est, comme chez l'Homme, suivie d'une déplétion lente et progressive pendant des années jusqu'au stade SIDA. Au contraire, les animaux d'origine indienne montrent une déplétion massive des LPL CD4⁺ intestinaux et une déplétion soutenue des lymphocytes T CD4⁺ circulants suivie d'un déclin rapide jusqu'au développement du SIDA en un à deux ans. De façon consistante, le nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans le sang des macaques rhésus indiens diminue de façon rapide et soutenue alors qu'il est caractérisé chez l'Homme par une augmentation transitoire (Monceaux et al., 2007). De plus, les charges virales observées chez les animaux indiens (au pic de virémie comme au set point) sont plus élevées que ce qui est connu chez l'Homme infecté (Ling, Veazey, Penedo, et al., 2002b). Enfin, une proportion substantielle de macaques rhésus indiens ne monte pas de réponse anticorps (Lewis et al., 1994), (Hirsch et al., 1996), (Sodora et al., 1998b), contrairement à l'Homme et au macaque rhésus chinois (Y. Zhou et al., 2013).

Toutefois, la relation entre déplétion des LPL et progression de la pathologie est mise à défaut dans les modèles non pathogènes dans lesquels la phase aiguë de l'infection se caractériserait également par une déplétion sévère des LPL CD4⁺ CCR5⁺ (Pandrea et al., 2007), (S. N. Gordon et al., 2007). De façon surprenante, certaines données de la littérature concernant les singes africains ne semblent pas cohérentes avec une déplétion massive des LPL CD4⁺. Une étude parue en 2008 rapporte en effet que les cellules Th17 du tractus gastro-intestinal des sooty mangabeys expérimentalement infectés sont préservées (Brenchley et al., 2008) et sont retrouvées à une fréquence comparable aux animaux contrôles non inoculés. Toutefois, une grande proportion des lymphocytes T helper de la lamina propria dans la muqueuse intestinale sont fonctionnellement de type Th17 (Atarashi et al., 2008), (Ivanov et al., 2008), suggérant donc que les LPL seraient également préservés dans ce modèle. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ du GALT des modèles non pathogènes expriment à faible niveau le corécepteur CCR5. Ces travaux confirmés pour plusieurs modèles d'infection non pathogènes (sooty mangabeys, singes verts d'Afrique, mandrills et chimpanzés), démontrent que les LPL CD4⁺ du GALT seraient préservés car peu susceptibles à l'infection par le SIV (Pandrea et al., 2006).

Chez l'Homme en phase chronique d'infection, la déplétion des LPL CD4⁺ serait à l'origine de la translocation de composants microbiens de la lumière intestinale vers la circulation sanguine (Brenchley et al., 2006). Mais les travaux récents sur les modèles non pathogènes ont donné naissance à la théorie en vigueur aujourd'hui qui voudrait que la translocation bactérienne soit initiée par une perturbation de l'étanchéité de la barrière intestinale indépendamment de la déplétion des lymphocytes T CD4⁺. D'ailleurs, les mesures du LPS plasmatique et *in situ* dans la muqueuse montrent une absence de translocation bactérienne pendant la phase aiguë chez le macaque rhésus indien comme chez l'Homme en primo-infection (Estes et al., 2010).

VI. Accumulation des macrophages dans la muqueuse pendant la phase aiguë de l'infection SIV

Les macrophages de la muqueuse intestinale sont essentiels au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et à l'élimination des pathogènes (Pull, Doherty, Mills, Gordon, & Stappenbeck, 2005). Alors que la perte d'étanchéité de la cette barrière est une caractéristique de l'infection chronique par le SIV et le VIH-1, les données concernant les macrophages de la muqueuse intestinale sont sporadiques. A ma connaissance, mes travaux de doctorat montrent pour la première fois l'accumulation des macrophages dans la lamina propria intestinale au cours de la phase aiguë de l'infection SIV. De plus, l'expression de la chimiokine CCL2 impliquée dans le recrutement des monocytes exprimant CCR2 est augmentée significativement dans l'iléon des animaux infectés à J10pi. Ces données suggèrent que l'infection de la muqueuse induirait le recrutement de monocytes circulants suivis de leur différenciation en macrophages à leur arrivée dans les tissus.

De façon concordante, chez l'Homme en phase chronique d'infection par le VIH-1, les macrophage s'accumulent dans la lamina propria du duodénum et cette accumulation a été corrélée avec les quantités protéiques de CCL2 de la muqueuse et non du plasma (Allers et al., 2014). Ces résultats sont d'une grande importance puisque les macrophages pourraient contribuer à l'homéostasie intestinale au cours de l'infection aiguë SIV chez le macaque rhésus chinois. De plus, les propriétés phagocytaires des macrophages semblent altérées chez les patients et les singes en phase chronique d'infection (Allers et al., 2014), (Estes et al., 2010). Ces découvertes impliquent une élimination insuffisante des produits bactériens qui infiltreraient alors le tissu muqueux, autorisant la translocation microbienne.

Par ailleurs, dans les pathologies inflammatoires du colon, les macrophages s'accumulent dans la muqueuse via l'arrivée massive de monocytes sanguins (Grimm et al., 1995).

L'infiltration de la lamina propria intestinale n'est pas documentée chez les animaux d'origine indienne et revêt une grande importance pour la compréhension de la pathogenèse dans ce modèle. Les propriétés pro-inflammatoires de ces nouveaux macrophages infiltrant la muqueuse serviraient, dans le modèle rhésus chinois, à contenir l'infection ou contribueraient à l'activation délétère du système immunitaire.

VII. Fluctuations de la population CD4⁺ CD3⁻ intestinale

Nos quantifications ont révélé une proportion importante de cellules CD4⁺ ne coexprimant pas CD3 dans la lamina propria des animaux sains. In situ, ces cellules possèdent le plus souvent une morphologie différente de celle des lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ et montrent des prolongements cytoplasmiques. Parfois, seuls ces prolongements sont détectés, parfois le corps cellulaire entourant le noyau (marqué en DAPI) est visible et possède un diamètre égal ou supérieur au diamètre des LPL CD3⁺. Un double marquage indique que ce sont probablement des macrophages, détectés par le marqueur PM-2K (Takeya et al., 1991) mais également CD68, CD169 et DC-SIGN. Chez l'Homme, les macrophages de la lamina propria intestinale expriment CD4 à plus faible niveau que les LPL CD4⁺ mais sont détectés par des marquages en immunohistofluorescence en utilisant un anti-CD4 (Brandtzaeg, Kiyono, Pabst, & Russell, 2008). Par conséquent, nous pouvons conclure que la majorité de ces cellules CD4⁺ CD3⁻ sont des macrophages. Cependant nous ne pouvons exclure que certaines de ces cellules sont également des cellules dendritiques, même si leur proportion est moindre dans les tissus en comparaison des macrophages (Turville, 2001).

Par ailleurs, la détection des macrophages montre qu'ils sont nombreux dans la sous-muqueuse drainant la lamina propria. Les recherches sur cette tunique sont rares mais il est connu depuis 1975 que la sous-muqueuse du colon des macaques rhésus contient effectivement des macrophages (Mankes & Abraham, 1975). Une population macrophage-like exprimant DC-SIGN vient d'être découverte dans la muqueuse et la sous-muqueuse colique humaine (Preza et al., 2014). Les auteurs concluent à une prédominance de macrophages CD68⁺ et CD163⁺ dans la sous-muqueuse.

Mes travaux de doctorat soulèvent de nombreuses questions à propos de cette population majoritaire dans la sous-muqueuse. Son identification précise est requise pour permettre des études plus éclairées, déterminer la susceptibilité de ces cellules à l'infection SIV/HIV et leur fonction lors de l'infection aiguë.

VIII. Conséquences de l'infection sur l'expression de l'IL-7

Peu avant mon arrivée au laboratoire, une nouvelle propriété de l'IL-7 a été mise en lumière chez le macaque rhésus. L'injection d'IL-7 simienne recombinante à des animaux sains induit une lymphopénie transitoire. Ce phénomène est également observé chez les patients traités à l'IL-7 (Sportes et al., 2008), (Sereti et al., 2009). Cette lymphopénie T s'avère être la conséquence d'une redistribution des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes. Au jour 1 post-injection, l'expression des chimiokines CCL19, CCL21, CCL20 et CCL25 est déjà augmentée dans de multiples organes. Sept jours après injection, l'expression des chimiokines CCL19, CCL20 et CCL25 est significativement augmentée dans l'iléon des animaux. En parallèle, l'expression de CXCR4, CCR6 et CCR9 est augmentée en surface des lymphocytes T CD4 et CD8 circulants (Beq et al., 2009). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une production d'IL-7 endogène, induite au cours des premiers jours suivant l'infection, serait impliquée dans l'augmentation de l'expression des chimiokines par la muqueuse intestinale des singes.

Pour explorer l'impact de l'infection SIV sur l'expression de l'IL-7 par la muqueuse intestinale, nous avons quantifié son expression dans tous les segments de l'intestin et le rectum chez les macaques rhésus sains et après infection SIV. La quantité basale d'IL-7 transcrite chez les singes sains est faible puisqu'elle est inférieure à la concentration en transcrits codant HPRT. De façon intéressante, nous dénotons une augmentation significative de la transcription d'IL-7 dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon alors qu'elle reste pratiquement stable dans le colon et le rectum. Cette augmentation s'avère donc spécifique à l'intestin grêle et suggère des mécanismes spécifiques de régulation de l'expression de l'IL-7 dans cette muqueuse.

L'élévation de la concentration en ARNm codant l'IL-7 est significative dès J3pi, suggérant un impact rapide de l'infection SIV, qu'il soit direct ou indirect, sur la production de cette interleukine. A 14pi, bien que la différence reste significative, une diminution nette est observée par rapport à J10pi, suggérant un retour à la normale de la production d'IL-7 après le pic observé à J7pi (par dégradation de l'ARNm ou par arrêt de sa production). A ce jour, les signaux environnementaux qui provoquent la production d'IL-7 par les cellules épithéliales de l'intestin sont encore méconnus.

Chez la souris, l'administration d'un agoniste des TLR3 induit l'augmentation de la production d'IL-7 par les cellules épithéliales des glandes salivaires. De plus, cette augmentation serait essentielle à l'augmentation subséquente de l'expression de la chimiokine CXCL9 dans ce modèle (J.-O. Jin, Shinohara, & Yu, 2013). Ainsi, la production endogène d'IL-7 consisterait probablement en une réponse rapide à l'invasion de la muqueuse par le virus. Chez l'Homme, d'autres cytokines comme le TNF ou bien encore l'IL-6 sont produites très tôt dans la muqueuse vaginale en réponse à l'infection virale et représentent peut-être une cible thérapeutique (Katsikis, Mueller, & Villinger, 2011)

De façon intéressante, nous montrons que l'expression de l'IL-7 et des chimiokines montre une bonne corrélation dans l'intestin grêle des singes chinois pendant les 14 premiers jours après infection. L'IL-7 est actuellement testée au laboratoire chez le macaque rhésus pour son effet adjuvant dans une éventuelle formulation de vaccination muqueuse, en vue d'augmenter le recrutement de cellules immuno-compétentes vers la muqueuse vaginale. Les premiers résultats montrent qu'une pulvérisation d'IL-7 appliquée sur les muqueuses rectale et vaginale de macaques rhésus sains induit l'augmentation de l'expression de nombreuses chimiokines ainsi que le recrutement de lymphocytes T et B, macrophages et cellules dendritiques (Magali Rancez et col., résultats non publiés).

L'IL-7 induit la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD127⁺. Ainsi, une prolifération excessive de ces cellules expliquerait l'absence de déplétion des LPL CD4⁺ observée et l'augmentation du nombre de LPL CD8⁺. Par conséquent, nous avons regardé la prolifération des LPL CD4⁺ après infection par le SIV. D'après nos résultats, la surface globale occupée par le marquage Ki67 dans la lamina propria iléale des animaux d'origine chinoise ne varie pas significativement de J0 à J14pi. Ces recherches nécessitent toutefois d'être approfondies par le comptage des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ coexprimant KI67. Il a été montré *in vitro* un effet dose de cette cytokine, de faibles concentration étant suffisantes pour induire la survie des lymphocytes T CD127⁺ naïfs alors que des concentrations supérieures seraient requises pour activer leur entrée en cycle (Swainson et al., 2006). Malheureusement, la mesure de la concentration protéique d'IL-7 *in vivo* dans la muqueuse représente un défi technique étant donné sa faible production (Kim et al., 2011). Nous pouvons toutefois espérer que l'augmentation transitoire de sa production serait décelable.

Une autre question soulevée par cette augmentation de la production endogène d'IL-7 est sa contribution à la prolifération des lymphocytes T infectés. Quelques équipes se sont penchées sur le phénotypage des cellules T intestinales infectées chez le macaque rhésus indien au cours des premiers jours suivant l'infection. Pour Veazey et collègues, il s'agit de cellules CD4⁺ CCR5⁺ activées et en prolifération caractérisées par l'expression de CD69, un marqueur précoce d'activation (Veazey, 1998), (Veazey et al., 2000) (intestin grêle et colon) et (Wang et al., 2011) (jéjunum). In situ, la détection de l'ARN viral dans le colon des animaux infectés dès J4pi par l'équipe d'Ashley Haase indique que la majorité des cellules productivement infectées dans la lamina propria sont des lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ Ki-67- CD69- (Q. Li et al., 2005). Cette dernière étude propose de nommer ces lymphocytes T « resting memory » puisqu'elles sont caractérisées par un phénotype mémoire mais ne semblent ni activées ni en prolifération. Plus tard, à J28pi, les cellules infectées de la lamina propria seraient alors caractérisées par l'expression de Ki67, marqueur de prolifération cellulaire.

Il semble donc clair que les lymphocytes T CD4⁺ ne prolifèrent pas de façon conséquente dans la lamina propria saine de l'intestin grêle et du colon les tous premiers jours suivants l'infection par le SIV. Cependant, il est possible que l'IL-7 fasse proliférer les cellules infectées au niveau des follicules lymphoïdes isolés et plaques de Peyer. Par conséquent, il est nécessaire de mieux définir les signaux qui régulent la production de l'IL-7 par les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et mieux comprendre les conséquences de l'augmentation locale de cette cytokine.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mon doctorat apporte de nouveaux éléments sur la pathogenèse induite par le SIVmac dans le modèle du macaque rhésus chinois les premiers jours après l'infection. Ce modèle, pourtant reconnu pertinent pour la compréhension de la pathologie induite par le VIH-1, demeure peu exploré. En particulier, nous apportons des résultats nouveaux sur l'altération de l'homéostasie lymphocytaire périphérique et intestinale dans ce modèle, perturbations considérées aujourd'hui comme essentielles au cours de la physiopathologie des infections SIV et VIH.

La dissémination rapide et importante du virus dans la muqueuse intestinale signifie que l'établissement des réservoirs viraux muqueux s'effectue dès le 3^e jour après l'infection par le SIV. En particulier, l'iléon semble être une cible privilégiée de la réplication virale. Plusieurs études récentes rapportent également une charge virale importante dans l'intestin grêle des patients infectés par le VIH-1. Par conséquent, il semble que les stratégies visant à limiter la mise en place des réservoirs ou leur éradication devraient cibler non seulement les muqueuses génitales mais également les muqueuses digestives.

Malgré la dissémination rapide du virus dans l'iléon au cours des quinze premiers jours post-infection, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ semble préservé dans la lamina propria des macaques rhésus chinois. L'infection dans ce modèle animal étant moins pathogène que chez les macaques d'origine indienne, il est possible que la déplétion de des cellules T CD4⁺ de la muqueuse iléale soit corrélée à l'évolution de la pathologie induite par le virus. Toutefois, la relation entre la progression de la pathologie et la déplétion des LPL CD4⁺ a récemment été remise en cause et reste à clarifier. En effet, depuis peu, les recherches tendent à mettre en lumière des perturbations de la barrière intestinale indépendante de la déplétion des LPL. Ces perturbations survenant très précocement après infection restent à établir dans le modèle chinois, ainsi que leurs conséquences sur l'évolution de la pathologie virale.

En parallèle d'une diminution transitoire du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ circulants au jour 10 post-infection, l'augmentation simultanée de l'expression de nombreuses chimiokines par l'iléon nous a permis de formuler une hypothèse vraisemblable selon laquelle les lymphocytes T circulants seraient recrutés dans la muqueuse iléale. Ce recrutement serait très localisé puisque l'augmentation de l'expression de la majorité des chimiokines n'est pas observée dans les autres segments du tractus digestif.

Nos travaux apportent également des connaissances fondamentales sur les populations immunitaires de la sous-muqueuse intestinale qui ne font l'objet que de rares études. Alors que les lymphocytes T et B n'y sont pas représentés, les macrophages caractérisés par l'expression de CD4, PM-2K, CD169, CD68 et DC-SIGN sont les cellules les plus abondantes dans la sous-muqueuse des animaux sains.

Lors de l'infection SIV aiguë, ces macrophages migreraient vers la lamina propria plus proche de l'épithélium muqueux. Une augmentation de l'expression des chimiokines telles que CCL2, CCL5 et CXCL10 pourrait être à l'origine de cette redistribution. Nous pensons que la relocalisation des macrophages de la sous-muqueuse vers la muqueuse bordant l'épithélium est un mécanisme général de lutte contre les infections ciblant le tractus digestif. Les macrophages attirés dans la lamina propria permettraient (i) d'éliminer des agents infectieux et de stimuler la réponse adaptative, via leurs propriétés de phagocytose et (ii) de favoriser le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale via leurs propriétés de réparation tissulaire. Par conséquent, il serait très intéressant de poursuivre ces travaux par une étude fonctionnelle de ces macrophages pour mieux déterminer leur rôle dans les phases précoces de l'infection par le SIV.

Parmi les signaux de danger induits en réponse au virus, l'interleukine-7 produite dans la muqueuse intestinale participerait à l'induction de l'expression des chimiokines. Nous avons pu montrer qu'au moins certaines augmentations d'expression de chimiokines observées au cours de l'infection sont également retrouvées dans la muqueuse des animaux sains injectés avec des doses pharmacologiques d'IL-7. Ainsi, l'IL-7 contribuerait à l'initiation des réponses innées et adaptatives dans la muqueuse intestinale. Les cellules responsables de la surexpression d'IL-7 suite à l'infection restent à identifier.

L'ensemble de ces données suggère que l'infection SIV induit des modifications profondes du profil d'expression des chimiokines par la muqueuse iléale, en partie induite par une surproduction locale d'IL-7. Ces changements induiraient le recrutement de lymphocytes T circulants et provoqueraient la relocalisation des macrophages dans la lamina propria, site effecteur de la réponse immune. Alors que l'augmentation du nombre de lymphocytes T cytotoxiques et de macrophages signe la mise en place d'une réponse immune dans la muqueuse iléale, le recrutement de lymphocytes T CD4⁺ hautement permissifs à l'infection, pourrait contribuer à l'établissement des réservoirs viraux en alimentant la réplication virale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, D. H., & Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 244–251. doi:10.1038/nri1784
- Allers, K., Fehr, M., Conrad, K., Epple, H. J., Schurmann, D., Geelhaar-Karsch, A., et al. (2014). Macrophages Accumulate in the Gut Mucosa of Untreated HIV-infected Patients. *Journal of Infectious Diseases*, 209(5), 739–748. doi:10.1093/infdis/jit547
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 117(2), 145–152.
- Alon, R., & Feigelson, S. W. (2009). Chemokine Signaling to Lymphocyte Integrins Under Shear Flow. *Microcirculation*, 16(1), 3–16. doi:10.1080/10739680802026076
- Alter, G. (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood*, 106(10), 3366–3369. doi:10.1182/blood-2005-03-1100
- Amedee, A. M., Lacour, N., & Ratterree, M. (2003). Mother-to-infant transmission of SIV via breast-feeding in rhesus macaques. *Journal of Medical Primatology*, 32(4-5), 187–193.
- Ananworanich, J., Schuetz, A., Vandergeeten, C., Sereti, I., de Souza, M., Rerknimitr, R., et al. (2012). Impact of Multi-Targeted Antiretroviral Treatment on Gut T Cell Depletion and HIV Reservoir Seeding during Acute HIV Infection. *PLoS ONE*, 7(3), e33948. doi:10.1371/journal.pone.0033948.t002
- Anderle, P., Rumbo, M., Sierro, F., Mansourian, R., Michetti, P., Roberts, M. A., & Kraehenbuhl, J.-P. (2005). Novel Markers of the Human Follicle—Associated Epithelium Identified by Genomic Profiling and Microdissection. *Gastroenterology*, 129(1), 321–327. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.044
- Ansari, A. A., Reimann, K. A., Mayne, A. E., Takahashi, Y., Stephenson, S. T., Wang, R., et al. (2011). Blocking of $\alpha 4 \beta 7$ Gut-Homing Integrin during Acute Infection Leads to Decreased Plasma and Gastrointestinal Tissue Viral Loads in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. *The Journal of Immunology*, 186(2), 1044–1059. doi:10.4049/jimmunol.1003052
- Anton, P. A., Elliott, J., Poles, M. A., McGowan, I. M., Matud, J., Hultin, L. E., et al. (2000). Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *AIDS (London, England)*, 14(12), 1761–1765.
- Ara, T., Itoi, M., Kawabata, K., Egawa, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., et al. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(9), 4649–4655.
- Armah, H. B., Wilson, N. O., Sarfo, B. Y., Powell, M. D., Bond, V. C., Anderson, W., et al. (2007). Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malaria Journal*, 6(1), 147. doi:10.1186/1475-2875-6-147
- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., et al. (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nature Immunology*, 9(3), 301–309. doi:10.1038/ni1566
- Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., et al. (2008). ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature*, 455(7214), 808–812. doi:10.1038/nature07240
- Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A. M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., et al. (2013). International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 1–79.

doi:10.1124/pr.113.007724

- Bachelierie, F., Graham, G. J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P. M., Nibbs, R., et al. (2014). New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nature Immunology*, 15(3), 207–208. doi:10.1038/ni.2812
- Bai, Z., Hayasaka, H., Kobayashi, M., Li, W., Guo, Z., Jang, M. H., et al. (2009). CXC Chemokine Ligand 12 Promotes CCR7-Dependent Naive T Cell Trafficking to Lymph Nodes and Peyer's Patches. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1287–1295. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1287
- Baird, J. W., Nibbs, R. J., Komai-Koma, M., Connolly, J. A., Ottersbach, K., Clark-Lewis, I., et al. (1999). ESkin, a novel beta-chemokine, is differentially spliced to produce secretable and nuclear targeted isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33496–33503.
- Baize, S., Marianneau, P., Loth, P., Reynard, S., Journeaux, A., Chevallier, M., et al. (2009). Early and Strong Immune Responses Are Associated with Control of Viral Replication and Recovery in Lassa Virus-Infected Cynomolgus Monkeys. *Journal of Virology*, 83(11), 5890–5903. doi:10.1128/JVI.01948-08
- Bargatze, R. F., Jutila, M. A., & Butcher, E. C. (1995). Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity*, 3(1), 99–108.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871.
- Baskin, G. B., Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Davison-Fairburn, B., Hu, F. S., & Kuebler, D. (1991). Thymus in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 65(4), 400–407.
- Beq, S., Nugeyre, M.-T., Ho Tsong Fang, R., Gautier, D., Legrand, R., Schmitt, N., et al. (2006). IL-7 induces immunological improvement in SIV-infected rhesus macaques under antiviral therapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(2), 914–922.
- Beq, S., Rozlan, S., Gautier, D., Parker, R., Mersseman, V., Schilte, C., et al. (2009). Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood*, 114(4), 816–825. doi:10.1182/blood-2008-11-191288
- Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyö, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., et al. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature*, 391(6664), 240. doi:10.1038/34571
- Bienzle, D. (2014). FIV in cats--a useful model of HIV in people? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 159(3-4), 171–179. doi:10.1016/j.vetimm.2014.02.014
- Bilenker, M., Roberts, A. I., Brolin, R. E., & Ebert, E. C. (1995). Interleukin-7 activates intestinal lymphocytes. *Digestive Diseases and Sciences*, 40(8), 1744–1749.
- Biswas, R., Datta, S., Gupta, J. D., Novotny, M., Tebo, J., & Hamilton, T. A. (2003). Regulation of Chemokine mRNA Stability by Lipopolysaccharide and IL-10. *The Journal of Immunology*, 170(12), 6202–6208. doi:10.4049/jimmunol.170.12.6202
- Bleul, C. C., & Boehm, T. (2000). Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *European Journal of Immunology*, 30(12), 3371–3379. doi:10.1002/1521-4141(200012)30:12<3371::AID-IMMU3371>3.0.CO;2-L
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., & Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1925–1930.
- Blish, C. A., McClelland, R. S., Richardson, B. A., Jaoko, W., Mandaliya, K., Baeten, J. M., & Overbaugh, J. (2012). Genital Inflammation Predicts HIV-1 Shedding Independent of

- Plasma Viral Load and Systemic Inflammation. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 61(4), 436–440. doi:10.1097/QAI.0b013e31826c2edd
- Blom, B., Verschuren, M. C., Heemskerk, M. H., Bakker, A. Q., van Gastel-Mol, E. J., Wolvers-Tettero, I. L., et al. (1999). TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood*, 93(9), 3033–3043.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., & Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 68(9), 6103–6110.
- Bosisio, D., Salvi, V., Gagliostro, V., & Sozzani, S. (2014). Angiogenic and antiangiogenic chemokines. *Chemical Immunology and Allergy*, 99, 89–104. doi:10.1159/000353317
- Bowman, E. P., Kuklin, N. A., Youngman, K. R., Lazarus, N. H., KUNKEL, E. J., Pan, J., et al. (2002). The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(2), 269–275.
- Brainard, D. M., Seung, E., Frahm, N., Cariappa, A., Bailey, C. C., Hart, W. K., et al. (2009). Induction of Robust Cellular and Humoral Virus-Specific Adaptive Immune Responses in Human Immunodeficiency Virus-Infected Humanized BLT Mice. *Journal of Virology*, 83(14), 7305–7321. doi:10.1128/JVI.02207-08
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology*, 1(1), 31–37. doi:10.1038/mi.2007.9
- Brenchley, J. M. (2004). CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Experimental Medicine*, 200(6), 749–759. doi:10.1084/jem.20040874
- Brenchley, J. M., Paiardini, M., Knox, K. S., Asher, A. I., Cervasi, B., Asher, T. E., et al. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*, 112(7), 2826–2835. doi:10.1182/blood-2008-05-159301
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), 1365–1371. doi:10.1038/nm1511
- Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., Cochran, N., Bloom, S., Wilson, J., et al. (1997). Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *The American Journal of Pathology*, 151(1), 97–110.
- Brownell, J., Bruckner, J., Wagoner, J., Thomas, E., Loo, Y. M., Gale, M., et al. (2014). Direct, Interferon-Independent Activation of the CXCL10 Promoter by NF- B and Interferon Regulatory Factor 3 during Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology*, 88(3), 1582–1590. doi:10.1128/JVI.02007-13
- Broxmeyer, H. E. (2008). Chemokines in hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 15(1), 49–58. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f29012
- Butcher, E. C., & Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272(5258), 60–66.
- Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., & Briskin, M. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Advances in Immunology*, 72, 209–253.
- CAMPBELL, D. J., & BUTCHER, E. C. (2002). Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1), 135–141.
- Campbell, J. J. (1998). Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science*, 279(5349), 381–384. doi:10.1126/science.279.5349.381
- Campbell-Yesufu, O. T., & Gandhi, R. T. (2011). Update on Human Immunodeficiency Virus (HIV)-2 Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 52(6), 780–787. doi:10.1093/cid/ciq248

- Carlsen, H. S., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., & Baekkevold, E. S. (2005). Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood*, 106(2), 444–446. doi:10.1182/blood-2004-11-4353
- Carr, J. M., Hocking, H., Li, P., & Burrell, C. J. (1999). Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology*, 265(2), 319–329. doi:10.1006/viro.1999.0047
- Caselli, E. (2005). Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood*, 106(8), 2790–2797. doi:10.1182/blood-2005-04-1390
- Cassatella, M. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bertagnin, A., Luster, A. D., & McDonald, P. P. (1997). Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *European Journal of Immunology*, 27(1), 111–115. doi:10.1002/eji.1830270117
- Cerf-Bensussan, N., Jarry, A., Brousse, N., Lisowska-Grospierre, B., Guy-Grand, D., & Griscelli, C. (1987). A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 17(9), 1279–1285. doi:10.1002/eji.1830170910
- Chahroudi, A., Bosinger, S. E., Vanderford, T. H., Paiardini, M., & Silvestri, G. (2012). Natural SIV Hosts: Showing AIDS the Door. *Science*, 335(6073), 1188–1193. doi:10.1126/science.1217550
- Champoux, M., Higley, J. D., & Suomi, S. J. (1997). Behavioral and physiological characteristics of Indian and Chinese-Indian hybrid rhesus macaque infants. *Developmental Psychobiology*, 31(1), 49–63.
- Chen, S., Lai, C., Wu, X., Lu, Y., Han, D., Guo, W., et al. (2011). Variability of Bio-Clinical Parameters in Chinese-Origin Rhesus Macaques Infected with Simian Immunodeficiency Virus: A Nonhuman Primate AIDS Model. *PLoS ONE*, 6(8), e23177. doi:10.1371/journal.pone.0023177.t001
- Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H., et al. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 387(6629), 183–188. doi:10.1038/387183a0
- Cicala, C., Martinelli, E., McNally, J. P., Goode, D. J., Gopaul, R., Hiatt, J., et al. (2009). The integrin $\alpha 4\beta 7$ forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20877–20882. doi:10.1073/pnas.0911796106
- Cicone, E. J., Greenwald, J. H., Lee, P. I., Biancotto, A., Read, S. W., Yao, M. A., et al. (2011). CD4+ T Cells, Including Th17 and Cycling Subsets, Are Intact in the Gut Mucosa of HIV-1-Infected Long-Term Nonprogressors. *Journal of Virology*, 85(12), 5880–5888. doi:10.1128/JVI.02643-10
- Cimbro, R., Vassena, L., Arthos, J., Cicala, C., Kehrl, J. H., Park, C., et al. (2012). IL-7 induces expression and activation of integrin $\alpha 4\beta 7$ promoting naive T-cell homing to the intestinal mucosa. *Blood*, 120(13), 2610–2619. doi:10.1182/blood-2012-06-434779
- Cinque, P., Bestetti, A., Marenzi, R., Sala, S., Gisslen, M., Hagberg, L., & Price, R. W. (2005). Cerebrospinal fluid interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in HIV-1 infection. *Journal of Neuroimmunology*, 168(1-2), 154–163. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.07.002
- Clarke, M. R., & O'Neil, J. A. (1999). Morphometric comparison of Chinese-origin and Indian-derived rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*,

- 47(4), 335–346. doi:10.1002/(SICI)1098-2345(1999)47:4<335::AID-AJP5>3.0.CO;2-Y
- Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343–346.
- Clay, C. C., Rodrigues, D. S., Harvey, D. J., Leutenegger, C. M., & Esser, U. (2005). Distinct Chemokine Triggers and In Vivo Migratory Paths of Fluorescein Dye-Labeled T Lymphocytes in Acutely Simian Immunodeficiency Virus SIVmac251-Infected and Uninfected Macaques. *Journal of Virology*, 79(21), 13759–13768. doi:10.1128/JVI.79.21.13759-13768.2005
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., & Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, 270(5243), 1811–1815.
- Collins, T. L., Uniyal, S., Shin, J., Strominger, J. L., Mittler, R. S., & Burakoff, S. J. (1992). p56lck association with CD4 is required for the interaction between CD4 and the TCR/CD3 complex and for optimal antigen stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), 2159–2162.
- Connor, S. J., Paraskevopoulos, N., Newman, R., Cuan, N., Hampartzoumian, T., Lloyd, A. R., & Grimm, M. C. (2004). CCR2 expressing CD4+ T lymphocytes are preferentially recruited to the ileum in Crohn's disease. *Gut*, 53(9), 1287–1294. doi:10.1136/gut.2003.028225
- Cornes, J. S. (1965). Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut*, 6(3), 225–229.
- Cose, S., Brammer, C., Khanna, K. M., Masopust, D., & Lefrançois, L. (2006). Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *European Journal of Immunology*, 36(6), 1423–1433. doi:10.1002/eji.200535539
- Couëdel-Courteille, A., Prétet, J. L., Barget, N., Jacques, S., Petitprez, K., Tulliez, M., et al. (2003). Delayed viral replication and CD4(+) T cell depletion in the rectosigmoid mucosa of macaques during primary rectal SIV infection. *Virology*, 316(2), 290–301. doi:10.1016/S0042-6822(03)00616-0
- Cumont, M.-C., Diop, O., Vaslin, B., Elbim, C., Viollet, L., Monceaux, V., et al. (2008). Early Divergence in Lymphoid Tissue Apoptosis between Pathogenic and Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections of Nonhuman Primates. *Journal of Virology*, 82(3), 1175–1184. doi:10.1128/JVI.00450-07
- Cumont, M.-C., Monceaux, V., Viollet, L., Lay, S., Parker, R., Hurtrel, B., & Estaquier, J. (2007). TGF- β in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death and Differentiation*, 14(10), 1747–1758. doi:10.1038/sj.cdd.4402192
- Cunha, B. A., Minnaganti, V., Johnson, D. H., & Klein, N. C. (2000). Profound and prolonged lymphocytopenia with West Nile encephalitis. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31(4), 1116–1117. doi:10.1086/318156
- Cyster, J. G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annual Review of Immunology*, 23, 127–159. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), 763–767.
- Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., et al.

- (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*, 228(4704), 1201–1204.
- Daniel, M. D., Letvin, N. L., Sehgal, P. K., Hunsmann, G., Schmidt, D. K., King, N. W., & Desrosiers, R. C. (1987). Long-term persistent infection of macaque monkeys with the simian immunodeficiency virus. *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 12), 3183–3189.
- Davenport, M. P., Zhang, L., Shiver, J. W., Casmiro, D. R., Ribeiro, R. M., & Perelson, A. S. (2006). Influence of peak viral load on the extent of CD4+ T-cell depletion in simian HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999), 41(3), 259–265. doi:10.1097/01.qai.0000199232.31340.d3
- de Parseval, A., Chatterji, U., Sun, P., & Elder, J. H. (2004). Feline immunodeficiency virus targets activated CD4+ T cells by using CD134 as a binding receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 13044–13049. doi:10.1073/pnas.0404006101
- De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., & Roederer, M. (2001). 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature Medicine*, 7(2), 245–248. doi:10.1038/84701
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., et al. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*, 273(5283), 1856–1862.
- Deusch, K., Lüling, F., Reich, K., Classen, M., Wagner, H., & Pfeffer, K. (1991). A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *European Journal of Immunology*, 21(4), 1053–1059. doi:10.1002/eji.1830210429
- DeVries, M. E., Kelvin, A. A., Xu, L., Ran, L., Robinson, J., & Kelvin, D. J. (2005). Defining the Origins and Evolution of the Chemokine/Chemokine Receptor System. *The Journal of Immunology*, 176(1), 401–415. doi:10.4049/jimmunol.176.1.401
- Di Carlo, E., D'Antuono, T., Pompa, P., Giuliani, R., Rosini, S., Stuppia, L., et al. (2009). The Lack of Epithelial Interleukin-7 and BAFF/BLyS Gene Expression in Prostate Cancer as a Possible Mechanism of Tumor Escape from Immunosurveillance. *Clinical Cancer Research*, 15(9), 2979–2987. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1951
- Dion, M.-L., Poulin, J.-F., Bordi, R., Sylvestre, M., Corsini, R., Kettaf, N., et al. (2004). HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity*, 21(6), 757–768. doi:10.1016/j.immuni.2004.10.013
- Diop, O. M., Gueye, A., Dias-Tavares, M., Kornfeld, C., Faye, A., Ave, P., et al. (2000). High Levels of Viral Replication during Primary Simian Immunodeficiency Virus SIVagm Infection Are Rapidly and Strongly Controlled in African Green Monkeys. *Journal of Virology*, 74(16), 7538–7547. doi:10.1128/JVI.74.16.7538-7547.2000
- Díaz-San Segundo, F., Salguero, F. J., de Avila, A., de Marco, M. M. F., Sánchez-Martín, M. A., & Sevilla, N. (2006). Selective lymphocyte depletion during the early stage of the immune response to foot-and-mouth disease virus infection in swine. *Journal of Virology*, 80(5), 2369–2379. doi:10.1128/JVI.80.5.2369-2379.2006
- Donaghy, H. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood*, 101(11), 4505–4511. doi:10.1182/blood-2002-10-3189
- Dotan, I., Werner, L., Vigodman, S., Weiss, S., Brazowski, E., Maharshak, N., et al. (2010). CXCL12 is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system.

- Inflammatory Bowel Diseases*, 16(4), 583–592. doi:10.1002/ibd.21106
- Douek, D. C., Brenchley, J. M., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Okamoto, Y., et al. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature*, 417(6884), 95–98. doi:10.1038/417095a
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., et al. (1996). HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381(6584), 667–673. doi:10.1038/381667a0
- Dyer, K. D., Percopo, C. M., Fischer, E. R., Gabryszewski, S. J., & Rosenberg, H. F. (2009). Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood*, 114(13), 2649–2656. doi:10.1182/blood-2009-01-199497
- Eckstein, D. A., Penn, M. L., Korin, Y. D., Scripture-Adams, D. D., Zack, J. A., Kreisberg, J. F., et al. (2001). HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity*, 15(4), 671–682.
- Eksteen, B. (2004). Hepatic Endothelial CCL25 Mediates the Recruitment of CCR9⁺ Gut-homing Lymphocytes to the Liver in Primary Sclerosing Cholangitis. *Journal of Experimental Medicine*, 200(11), 1511–1517. doi:10.1084/jem.20041035
- Engelhardt, B., & Wolburg, H. (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European Journal of Immunology*, 34(11), 2955–2963. doi:10.1002/eji.200425327
- Erle, D. J., Briskin, M. J., Butcher, E. C., Garcia-Pardo, A., Lazarovits, A. I., & Tidswell, M. (1994). Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(2), 517–528.
- Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., Hauser, A. E., Town, T., Wan, Y. Y., et al. (2011). Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*, 475(7357), 514–518. doi:10.1038/nature10228
- Estaquier, J., Monceaux, V., Cumont, M.-C., Aubertin, A. M., Hurtrel, B., & Ameisen, J. C. (2000). Early changes in peripheral blood T cells during primary infection of rhesus macaques with a pathogenic SIV. *Journal of Medical Primatology*, 29(3-4), 127–135.
- Estes, J. D., Harris, L. D., Klatt, N. R., Tabb, B., Pittaluga, S., Paiardini, M., et al. (2010). Damaged Intestinal Epithelial Integrity Linked to Microbial Translocation in Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001052. doi:10.1371/journal.ppat.1001052.s011
- Everson, M. P., McDuffie, D. S., Lemak, D. G., Koopman, W. J., McGhee, J. R., & Beagley, K. W. (1996). Dendritic cells from different tissues induce production of different T cell cytokine profiles. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(4), 494–498.
- Fabre-Mersseman, V., Dutrieux, J., Louise, A., Rozlan, S., Lamine, A., Parker, R., et al. (2011). CD4⁺ recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis. *AIDS (London, England)*, 25(9), 1153–1162. doi:10.1097/QAD.0b013e3283471e89
- Fadilah, S. A., Sahrir, S., Raymond, A. A., Cheong, S. K., Aziz, J. A., & Sivagengei, K. (1999). Quantitation of T lymphocyte subsets helps to distinguish dengue hemorrhagic fever from classic dengue fever during the acute febrile stage. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 30(4), 710–717.
- Falk, I., Biro, J., Kohler, H., & Eichmann, K. (1996). Proliferation kinetics associated with T cell receptor-beta chain selection of fetal murine thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(6), 2327–2339.
- Fan, J., Ishmael, F. T., Fang, X., Myers, A., Cheadle, C., Huang, S. K., et al. (2011). Chemokine Transcripts as Targets of the RNA-Binding Protein HuR in Human Airway Epithelium. *The Journal of Immunology*, 186(4), 2482–2494.

doi:10.4049/jimmunol.0903634

- Fazely, F., Sharma, P. L., Fratazzi, C., Greene, M. F., Wyand, M. S., Memon, M. A., et al. (1993). Simian immunodeficiency virus infection via amniotic fluid: a model to study fetal immunopathogenesis and prophylaxis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999), 6(2), 107–114.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872–877.
- Ferguson, A. (1977). Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut*, 18, 921–993.
- Foss, D. L., Baarsch, M. J., & Murtaugh, M. P. (1998). Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal Biotechnology*, 9(1), 67–78. doi:10.1080/10495399809525893
- Frantz, A. L., Rogier, E. W., Weber, C. R., Shen, L., Cohen, D. A., Fenton, L. A., et al. (2012). Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Journal of Immunology*, 188(5), 501–512. doi:10.1038/mi.2012.23
- Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., et al. (2008). Small Intestine CD4+ T Cells Are Profoundly Depleted during Acute Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection, Regardless of Viral Pathogenicity. *Journal of Virology*, 82(12), 6039–6044. doi:10.1128/JVI.02753-07
- Fultz, P. N., McClure, H. M., Daugharty, H., Brodie, A., McGrath, C. R., Swenson, B., & Francis, D. P. (1986). Vaginal transmission of human immunodeficiency virus (HIV) to a chimpanzee. *The Journal of Infectious Diseases*, 154(5), 896–900.
- Ganusov, V. V., & De Boer, R. J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends in Immunology*, 28(12), 514–518. doi:10.1016/j.it.2007.08.009
- Gao, F., Yue, L., White, A. T., Pappas, P. G., Barchue, J., Hanson, A. P., et al. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature*, 358(6386), 495–499. doi:10.1038/358495a0
- Gapin, L., Cheroutre, H., & Kronenberg, M. (1999). Cutting edge: TCR alpha beta+ CD8 alpha alpha+ T cells are found in intestinal intraepithelial lymphocytes of mice that lack classical MHC class I molecules. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(8), 4100–4104.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., & Popovic, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*, 233(4760), 215–219.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., et al. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100(5), 587–597.
- Gill, A. F., Ahsan, M. H., Lackner, A. A., & Veazey, R. S. (2012). Hematologic abnormalities associated with simian immunodeficiency virus (SIV) infection mimic those in HIV infection. *Journal of Medical Primatology*, 41(3), 214–224. doi:10.1111/j.1600-0684.2012.00543.x
- Gillin, J. S., Shike, M., Alcock, N., Urmacher, C., Krown, S., Kurtz, R. C., et al. (1985). Malabsorption and mucosal abnormalities of the small intestine in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 102(5), 619–622.
- Golden-Mason, L., Kelly, A. M., Traynor, O., McEntee, G., Kelly, J., Hegarty, J. E., & O'Farrelly, C. (2001). EXPRESSION OF INTERLEUKIN 7 (IL-7) mRNA AND PROTEIN IN THE NORMAL ADULT HUMAN LIVER: IMPLICATIONS FOR EXTRATHYMIC T CELL DEVELOPMENT. *Cytokine*, 14(3), 143–151.

doi:10.1006/cyto.2001.0852

- González-Scarano, F., & Martín-García, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nature Reviews Immunology*, 5(1), 69–81. doi:10.1038/nri1527
- Goodyear, A. W., Kumar, A., Dow, S., & Ryan, E. P. (2014). Optimization of murine small intestine leukocyte isolation for global immune phenotype analysis. *Journal of Immunological Methods*, 405(C), 97–108. doi:10.1016/j.jim.2014.01.014
- Gordon, S. N., Klatt, N. R., Bosinger, S. E., Brenchley, J. M., Milush, J. M., Engram, J. C., et al. (2007). Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(5), 3026–3034.
- Gosselin, A., Monteiro, P., Chomont, N., Diaz-Griffero, F., Said, E. A., Fonseca, S., et al. (2010). Peripheral Blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+ CD4+ T Cells Are Highly Permissive to HIV-1 Infection. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1604–1616. doi:10.4049/jimmunol.0903058
- Goujard, C., Bonarek, M., Meyer, L., Bonnet, F., Chaix, M.-L., Deveau, C., et al. (2006). CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 709–715. doi:10.1086/500213
- Goulder, P. J., Bunce, M., Krausa, P., McIntyre, K., Crowley, S., Morgan, B., et al. (1996). Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12(18), 1691–1698.
- Gouwy, M., Struyf, S., Proost, P., & Van Damme, J. (2005). Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(6), 561–580. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.03.005
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., & Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS (London, England)*, 23(9), 1163–1169. doi:10.1097/QAD.0b013e32832b44c8
- Gratton, S., Cheynier, R., Dumaourier, M. J., Oksenhendler, E., & Wain-Hobson, S. (2000). Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14566–14571. doi:10.1073/pnas.97.26.14566
- Gray, C. M., Hong, H. A., Young, K., Lewis, D. A., Fallows, D., Manca, C., & Kaplan, G. (2013). Plasma Interferon-Gamma-Inducible Protein 10 Can Be Used to Predict Viral Load in HIV-1-Infected Individuals. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 63(3), e115–e116. doi:10.1097/QAI.0b013e3282930ea8
- Graziani-Bowering, G. M., & Fillion, L. G. (2000). Down Regulation of CD4 Expression following Isolation and Culture of Human Monocytes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 7(2), 182–191. doi:10.1128/CDLI.7.2.182-191.2000
- Griffiths, D. J. (2001). Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biology*, 2(6), REVIEWS1017.
- Grimm, M. C., Pullman, W. E., Bennett, G. M., Sullivan, P. J., Pavli, P., & Doe, W. F. (1995). Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10(4), 387–395.
- Guabiraba, R., Marques, R. E., Besnard, A.-G., Fagundes, C. T., Souza, D. G., Ryffel, B., & Teixeira, M. M. (2010). Role of the Chemokine Receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the Pathogenesis of Experimental Dengue Infection in Mice. *PLoS ONE*, 5(12), e15680. doi:10.1371/journal.pone.0015680.g008
- Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., & Dandekar, S.

- (2003). Severe CD4+ T-Cell Depletion in Gut Lymphoid Tissue during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Substantial Delay in Restoration following Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, 77(21), 11708–11717. doi:10.1128/JVI.77.21.11708-11717.2003
- Gueye, A., Diop, O. M., Ploquin, M. J. Y., Kornfeld, C., Faye, A., Cumont, M.-C., et al. (2004). Viral load in tissues during the early and chronic phase of non-pathogenic SIVagm infection. *Journal of Medical Primatology*, 33(2), 83–97. doi:10.1111/j.1600-0684.2004.00057.x
- Guidos, C., Wong, M., & Lee, K. C. (1984). A comparison of the stimulatory activities of lymphoid dendritic cells and macrophages in T proliferative responses to various antigens. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(3), 1179–1184.
- Guo, Z., Jang, M. H., Otani, K., Bai, Z., Umemoto, E., Matsumoto, M., et al. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *International Immunology*, 20(3), 307–315. doi:10.1093/intimm/dxm143
- Haller Hasskamp, J., Zapas, J. L., & Elias, E. G. (2005). Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults. *American Journal of Hematology*, 78(4), 314–315. doi:10.1002/ajh.20296
- Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., et al. (2002). Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. *The Journal of Immunology*, 168(1), 57–64. doi:10.4049/jimmunol.168.1.57
- Hamann, D., Kostense, S., Wolthers, K. C., Otto, S. A., Baars, P. A., Miedema, F., & van Lier, R. A. (1999). Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *International Immunology*, 11(7), 1027–1033.
- Hammerich, L., & Tacke, F. (2014). Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 5(2), 107–113. doi:10.4291/wjgp.v5.i2.107
- Hannan, N. J., Jones, R. L., White, C. A., & Salamonsen, L. A. (2006). The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biology of Reproduction*, 74(5), 896–904. doi:10.1095/biolreprod.105.045518
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132. doi:10.1038/ni1254
- Harrington, R. D., & Geballe, A. P. (1993). Cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 entry into a CD4-expressing human cell line. *Journal of Virology*, 67(10), 5939–5947.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792–804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004
- Hatzioannou, T., & Evans, D. T. (2012). Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(12), 852–867. doi:10.1038/nrmicro2911
- Hatzioannou, T., Ambrose, Z., Chung, N. P. Y., Piatak, M., Yuan, F., Trubey, C. M., et al. (2009). A macaque model of HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4425–4429. doi:10.1073/pnas.0812587106
- Havran, W. L., Chien, Y. H., & Allison, J. P. (1991). Recognition of self antigens by skin-

- derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Science*, 252(5011), 1430–1432.
- Hazenbergh, M. D., Otto, S. A., Wit, F. W. N. M., Lange, J. M. A., Hamann, D., & Miedema, F. (2002). Discordant responses during antiretroviral therapy: role of immune activation and T cell redistribution rather than true CD4 T cell loss. *AIDS (London, England)*, 16(9), 1287–1289.
- Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1–9. doi:10.3109/00365521.2014.898326
- Henry, M., Uthman, A., Ballaun, C., Stingl, G., & Tschachler, E. (1994). Epidermal langerhans cells of AIDS patients express HIV-1 regulatory and structural genes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 103(4), 593–596.
- Heufler, C., Topar, G., Grasseger, A., Stanzl, U., Koch, F., Romani, N., et al. (1993). Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(3), 1109–1114.
- Hirsch, V. M., Fuerst, T. R., Sutter, G., Carroll, M. W., Yang, L. C., Goldstein, S., et al. (1996). Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *Journal of Virology*, 70(6), 3741–3752.
- Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., & Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*, 339(6223), 389–392. doi:10.1038/339389a0
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373(6510), 123–126. doi:10.1038/373123a0
- Hogg, R. S., Yip, B., Chan, K. J., Wood, E., Craib, K. J., O'Shaughnessy, M. V., & Montaner, J. S. (2001). Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy. *JAMA : the Journal of the American Medical Association*, 286(20), 2568–2577.
- Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., et al. (1996). The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine*, 2(11), 1240–1243.
- Huet, T., Cheyrier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., & Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, 345(6273), 356–359. doi:10.1038/345356a0
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687.
- Iida, T., Ichimura, H., Ui, M., Shimada, T., Akahata, W., Igarashi, T., et al. (1999). Sequential analysis of apoptosis induction in peripheral blood mononuclear cells and lymph nodes in the early phase of pathogenic and nonpathogenic SIVmac infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 15(8), 721–729. doi:10.1089/088922299310818
- Innocenti, P., Ottmann, M., Morand, P., Leclercq, P., & Seigneurin, J. M. (2014). HIV-1 in blood monocytes: frequency of detection of proviral DNA using PCR and comparison with the total CD4 count. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8(2), 261–268.
- Iordanskiy, S., Santos, S., & Bukrinsky, M. (2013). Nature, nurture and HIV_ The effect of producer cell on viral physiology. *Virology*, 443(2), 208–213. doi:10.1016/j.virol.2013.05.023
- Iqbal, S. M., Ball, T. B., Kimani, J., Kiama, P., Thottingal, P., Embree, J. E., et al. (2005). Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(5), 728–738. doi:10.1086/432482

- Islam, S., Shimizu, N., Hoque, S. A., Jinno-Oue, A., Tanaka, A., & Hoshino, H. (2013). CCR6 Functions as a New Coreceptor for Limited Primary Human and Simian Immunodeficiency Viruses. *PLoS ONE*, 8(8), e73116. doi:10.1371/journal.pone.0073116.s002
- Ivanov, I. I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., et al. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host and Microbe*, 4(4), 337–349. doi:10.1016/j.chom.2008.09.009
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J. L., et al. (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 2139–2149. doi:10.1084/jem.20030996
- Jenkins, S. J., & Hume, D. A. (2014). Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends in Immunology*, 1–10. doi:10.1016/j.it.2014.06.006
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., Van Rooijen, N., et al. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 332(6035), 1284–1288. doi:10.1126/science.1204351
- Jenkinson, S. E., Whawell, S. A., Swales, B. M., Corps, E. M., Kilshaw, P. J., & Farthing, P. M. (2010). The α E(CD103) β 7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner*. *Immunology*, 132(2), 188–196. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03352.x
- Jin, J.-O., Shinohara, Y., & Yu, Q. (2013). Innate immune signaling induces interleukin-7 production from salivary gland cells and accelerates the development of primary Sjögren's syndrome in a mouse model. *PLoS ONE*, 8(10), e77605. doi:10.1371/journal.pone.0077605
- Jin, T., Xu, X., & Hereld, D. (2008). Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*, 44(1), 1–8. doi:10.1016/j.cyto.2008.06.017
- Johansson, M. E. V., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(6), 352–361. doi:10.1038/nrgastro.2013.35
- Jones, D. E., & Bevins, C. L. (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(32), 23216–23225.
- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.-P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., et al. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, 418(6894), 144. doi:10.1038/418144a
- Kader, M., Bixler, S., Roederer, M., Veazey, R., & Mattapallil, J. J. (2009a). CD4 T cell subsets in the mucosa are CD28 +Ki-67 –HLA-DR –CD69 +but show differential infection based on α 4 β 7 receptor expression during acute SIV infection. *Journal of Medical Primatology*, 38, 24–31. doi:10.1111/j.1600-0684.2009.00372.x
- Kader, M., Wang, X., Piatak, M., Lifson, J., Roederer, M., Veazey, R., & Mattapallil, J. J. (2009b). α 4 β 7hiCD4+ memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunology*, 2(5), 439–449. doi:10.1038/mi.2009.90
- Kahn, J. O., & Walker, B. D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England Journal of Medicine*, 339(1), 33–39. doi:10.1056/NEJM199807023390107
- Katsikis, P. D., Mueller, Y. M., & Villinger, F. (2011). The Cytokine Network of Acute HIV Infection: A Promising Target for Vaccines and Therapy to Reduce Viral Set-Point? *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002055. doi:10.1371/journal.ppat.1002055.g001

- Kaup, F.-J., Boga, J. A., Bruno, S. F., Didier, A., Hermann, K., Hofmann, P., et al. (2001). Immunohistochemical detection of simian immunodeficiency virus (SIV) in rectal mucosa of experimentally infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Acta Histochemica*, 103(1), 79–88. doi:10.1078/0065-1281-00577
- Kawka, E., Witowski, J., Fouquet, N., Tayama, H., Bender, T. O., Catar, R., et al. (2014). Regulation of chemokine CCL5 synthesis in human peritoneal fibroblasts- a key role of IFN- γ . *Mediators of Inflammation*, 1–9. doi:10.1155/2014/590654
- Kazazi, F., Mathijs, J. M., Foley, P., & Cunningham, A. L. (1989). Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus. *The Journal of General Virology*, 70 (Pt 10), 2661–2672.
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786), 523–526. doi:10.1126/science.1126531
- Kenway-Lynch, C. S., Das, A., Pan, D., Lackner, A. A., & Pahar, B. (2013). Dynamics of Cytokine/Chemokine Responses in Intestinal CD4+ and CD8+ T Cells during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Virology*, 87(21), 11916–11923. doi:10.1128/JVI.01750-13
- Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., & Hedrick, S. M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature Immunology*, 10(2), 176–184. doi:10.1038/ni.1689
- Kewenig, S., Schneider, T., Hohloch, K., Lampe-Dreyer, K., Ullrich, R., Stolte, N., et al. (1999). Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology*, 116(5), 1115–1123.
- Kieda, C. (2003). How endothelial cell organo-specificity mediates circulating cell homing. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 51(2), 81–89.
- Kim, G. Y., Hong, C., & Park, J.-H. (2011). Seeing Is Believing: Illuminating the Source of In Vivo Interleukin-7. *Immune Network*, 11(1), 1. doi:10.4110/in.2011.11.1.1
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., & Reinecker, H. C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*, 118(6), 1001–1011. doi:10.1053/gast.2000.8314
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guétard, D., Hercend, T., et al. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), 767–768.
- Klockars, M., & Reitamo, S. (1975). Tissue distribution of lysozyme in man. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 23(12), 932–940.
- Kotler, D. P., Gaetz, H. P., Lange, M., Klein, E. B., & Holt, P. R. (1984). Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 101(4), 421–428.
- Kronenberg, M. (2005). Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual Review of Immunology*, 23, 877–900. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115742
- Kuller, L., Morton, W. R., Benveniste, R. E., Tsai, C. C., Clark, E. A., Gale, M. J., et al. (1990). Inoculation of *Macaca fascicularis* with simian immunodeficiency virus, SIVmne immunologic, serologic, and pathologic changes. *Journal of Medical Primatology*, 19(3–4), 367–380.
- Kumar, P., Rajasekaran, K., Palmer, J. M., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2013). IL-22: An Evolutionary Missing-Link Authenticating the Role of the Immune System in Tissue

- Regeneration. *Journal of Cancer*, 4(1), 57–65. doi:10.7150/jca.5048
- KUNKEL, E. J., CAMPBELL, D. J., & BUTCHER, E. C. (2003). Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation*, 10(3-4), 313–323. doi:10.1038/sj.mn.7800196
- Kunkel, E. J., Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A. I., et al. (2000). Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 761–768.
- Kurashima, Y., Goto, Y., & Kiyono, H. (2013). Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *European Journal of Immunology*, 43(12), 3108–3115. doi:10.1002/eji.201343782
- Kuwata, T., Kodama, M., Sato, A., Suzuki, H., Miyazaki, Y., Miura, T., & Hayami, M. (2007). Contribution of Monocytes to Viral Replication in Macaques during Acute Infection with Simian Immunodeficiency Virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23(3), 372–380. doi:10.1089/aid.2006.0208
- Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., & Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 16(1), 135–144.
- Kyes, R. C., Jones-Engel, L., Chalise, M. K., Engel, G., Heidrich, J., Grant, R., et al. (2006). Genetic characterization of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Nepal. *American Journal of Primatology*, 68(5), 445–455. doi:10.1002/ajp.20240
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., & Robey, E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature Immunology*, 7(4), 338–343. doi:10.1038/ni1323
- Lambotte, O., Taoufik, Y., de Goër, M. G., Wallon, C., Goujard, C., & Delfraissy, J. F. (2000). Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999), 23(2), 114–119.
- Lang, W., Perkins, H., Anderson, R. E., Royce, R., Jewell, N., & Winkelstein, W. (1989). Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999), 2(1), 63–69.
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*, 290(5489), 92–97.
- Lasky, L. A. (1994). Sialomucin ligands for selectins: a new family of cell adhesion molecules. *Princess Takamatsu Symposia*, 24, 81–90.
- Lauren, A. (2006). Comparative studies on mucosal and intravenous transmission of simian immunodeficiency virus (SIVsm): evolution of coreceptor use varies with pathogenic outcome. *Journal of General Virology*, 87(3), 581–594. doi:10.1099/vir.0.81408-0
- Lee, S. H., Starkey, P. M., & Gordon, S. (1985). Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *The Journal of Experimental Medicine*, 161(3), 475–489.
- Lehner, T., Wang, Y., Cranage, M., Tao, L., Mitchell, E., Bravery, C., et al. (2000). Up-regulation of beta-chemokines and down-modulation of CCR5 co-receptors inhibit simian immunodeficiency virus transmission in non-human primates. *Immunology*, 99(4), 569–577.
- Lelièvre, J. D., & Lévy, Y. (2007). Perspectives on interleukin-7 therapy in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2(3), 228–233. doi:10.1097/COH.0b013e3280fb27a5
- Lever, A. M. L., & Berkhout, B. (2008). 2008 Nobel prize in Medicine for discoverers of HIV. *Retrovirology*, 5(1), 91. doi:10.1186/1742-4690-5-91

- Levy, Y., Sereti, I., Tambussi, G., Routy, J. P., Lelièvre, J. D., Delfraissy, J. F., et al. (2012). Effects of Recombinant Human Interleukin 7 on T-Cell Recovery and Thymic Output in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy: Results of a Phase I/IIa Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Study. *Clinical Infectious Diseases*, 55(2), 291–300. doi:10.1093/cid/cis383
- Lewis, M. G., Bellah, S., McKinnon, K., Yalley-Ogunro, J., Zack, P. M., Elkins, W. R., et al. (1994). Titration and characterization of two rhesus-derived SIVmac challenge stocks. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(2), 213–220.
- Ley, K., & Kansas, G. S. (2004). Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), 325–335. doi:10.1038/nri1351
- Li, Q., Duan, L., Estes, J. D., Ma, Z.-M., Rourke, T., Wang, Y., et al. (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*, 434(7037), 1148–1152. doi:10.1038/nature03513
- Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2271–2279. doi:10.1084/jem.20061308
- Lifson, J. D., Nowak, M. A., Goldstein, S., Rossio, J. L., Kinter, A., Vasquez, G., et al. (1997). The extent of early viral replication is a critical determinant of the natural history of simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*, 71(12), 9508–9514.
- Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., & Petrie, H. T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(2), 127–134.
- Ling, B., Rogers, L., Johnson, A.-M., Piatak, M., Lifson, J., & Veazey, R. S. (2013). Effect of Combination Antiretroviral Therapy on Chinese Rhesus Macaques of Simian Immunodeficiency Virus Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 29(11), 1465–1474. doi:10.1089/aid.2012.0378
- Ling, B., Veazey, R. S., Hart, M., Lackner, A. A., Kuroda, M., Pahar, B., & Marx, P. A. (2007). Early restoration of mucosal CD4 memory CCR5 T cells in the gut of SIV-infected rhesus predicts long term non-progression. *AIDS (London, England)*, 21(18), 2377–2385. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f08b32
- Ling, B., Veazey, R. S., Luckay, A., Penedo, C., Xu, K., Lifson, J. D., & Marx, P. A. (2002a). SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS (London, England)*, 16(11), 1489–1496.
- Ling, B., Veazey, R. S., Penedo, C., Xu, K., Lifson, J. D., & Marx, P. A. (2002b). Longitudinal follow up of SIVmac pathogenesis in rhesus macaques of Chinese origin: emergence of B cell lymphoma. *Journal of Medical Primatology*, 31(4-5), 154–163.
- Liovat, A.-S., Rey-Cuillé, M.-A., Lécoux, C., Jacquelin, B., Girault, I., Petitjean, G., et al. (2012). Acute Plasma Biomarkers of T Cell Activation Set-Point Levels and of Disease Progression in HIV-1 Infection. *PLoS ONE*, 7(10), e46143. doi:10.1371/journal.pone.0046143.s007
- Lo, J. C., Chin, R. K., Lee, Y., Kang, H.-S., Wang, Y., Weinstock, J. V., et al. (2003). Differential regulation of CCL21 in lymphoid/nonlymphoid tissues for effectively attracting T cells to peripheral tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1495–1505. doi:10.1172/JCI19188
- Locatelli, S., & Peeters, M. (2012). Cross-species transmission of simian retroviruses. *AIDS (London, England)*, 26(6), 659–673. doi:10.1097/QAD.0b013e328350fb68
- Lochner, M., Berard, M., Sawa, S., Hauer, S., Gaboriau-Routhiau, V., Fernandez, T. D., et al. (2011). Restricted Microbiota and Absence of Cognate TCR Antigen Leads to an

- Unbalanced Generation of Th17 Cells. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1531–1537. doi:10.4049/jimmunol.1001723
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., et al. (1996). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(3), 963–969.
- Lorenz, R. G., Chaplin, D. D., McDonald, K. G., McDonough, J. S., & Newberry, R. D. (2003). Isolated Lymphoid Follicle Formation Is Inducible and Dependent Upon Lymphotoxin-Sufficient B Lymphocytes, Lymphotoxin Receptor, and TNF Receptor I Function. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5475–5482. doi:10.4049/jimmunol.170.11.5475
- Lundström, W., Highfill, S., Walsh, S. T. R., Beq, S., Morse, E., Kockum, I., et al. (2013). Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), E1761–70. doi:10.1073/pnas.1222303110
- Lyles, R. H., Muñoz, A., Yamashita, T. E., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, C. R., et al. (2000). Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(3), 872–880. doi:10.1086/315339
- Macchia, I., Gauduin, M.-C., Kaur, A., & Johnson, R. P. (2006). Expression of CD8? identifies a distinct subset of effector memory CD4 +T lymphocytes. *Immunology*, 119(2), 232–242. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02428.x
- Mackall, C. L., Fry, T. J., & Gress, R. E. (2011). Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature Reviews Immunology*, 11(5), 330–342. doi:10.1038/nri2970
- Mackay, C. R. (1999). Dual personality of memory T cells. *Nature*, 401(6754), 659–660. doi:10.1038/44309
- Mackay, C. R., Marston, W. L., & Dudler, L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(3), 801–817.
- Maddur, M. S., Miossec, P., Kaveri, S. V., & Bayry, J. (2012). Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *The American Journal of Pathology*, 181(1), 8–18. doi:10.1016/j.ajpath.2012.03.044
- Magalhaes, I., Vudattu, N. K., Ahmed, R. K., Kühlmann-Berenzon, S., Ngo, Y., Sizemore, D. R., et al. (n.d.). High content cellular immune profiling reveals differences between rhesus monkeys and men. *Immunology*, no–no. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03284.x
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., & Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunology Today*, 13(8), 315–322.
- Mancardi, S., Vecile, E., Dusetti, N., Calvo, E., Stanta, G., Burrone, O. R., & Dobrina, A. (2003). Evidence of CXC, CC and C chemokine production by lymphatic endothelial cells. *Immunology*, 108(4), 523–530.
- Manches, O., & Bhardwaj, N. (2009). Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. *Journal of Clinical Investigation*. doi:10.1172/JCI41509
- Mankes, R., & Abraham, R. (1975). Lysosomal dysfunction in colonic submucosal macrophages of rhesus monkeys caused by degraded iota carrageenan. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 150(1), 166–170.
- Mannioui, A., Bourry, O., Sellier, P., Delache, B., Brochard, P., Andrieu, T., et al. (2009). Dynamics of viral replication in blood and lymphoid tissues during SIVmac251 infection of macaques. *Retrovirology*, 6(1), 106. doi:10.1186/1742-4690-6-106

- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2012). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, 229(2), 176–185. doi:10.1002/path.4133
- Marchetti, G., Tincati, C., & Silvestri, G. (2013). Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 2–18. doi:10.1128/CMR.00050-12
- Marçais, A., Tomkowiak, M., Walzer, T., Coupet, C.-A., Ravel-Chapuis, A., & Marvel, J. (2006). Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *European Journal of Immunology*, 36(10), 2745–2754. doi:10.1002/eji.200636259
- Margolis, L. B., Glushakova, S., Grivel, J. C., & Murphy, P. M. (1998). Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *Journal of Clinical Investigation*, 101(9), 1876–1880. doi:10.1172/JCI2015
- Marthas, M. L., Lu, D., Penedo, M. C. T., Hendrickx, A. G., & Miller, C. J. (2001). Titration of an SIVmac251 Stock by Vaginal Inoculation of Indian and Chinese Origin Rhesus Macaques: Transmission Efficiency, Viral Loads, and Antibody Responses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17(15), 1455–1466. doi:10.1089/088922201753197123
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., & Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434(7037), 1093–1097. doi:10.1038/nature03501
- Mattapallil, J. J., Letvin, N. L., & Roederer, M. (2004). T-cell dynamics during acute SIV infection. *AIDS (London, England)*, 18(1), 13–23. doi:10.1097/01.aids.0000096899.73209.b6
- Mavigner, M., Cazabat, M., Dubois, M., L’Faqihi, F.-E., Requena, M., Pasquier, C., et al. (2012). Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 62–69. doi:10.1172/JCI59011DS1
- Mazzucchelli, R. I., Warming, S., Lawrence, S. M., Ishii, M., Abshari, M., Washington, A. V., et al. (2009). Visualization and Identification of IL-7 Producing Cells in Reporter Mice. *PLoS ONE*, 4(11), e7637. doi:10.1371/journal.pone.0007637.s006
- McDonnel, S. J., Sparger, E. E., & Murphy, B. G. (2013). Feline immunodeficiency virus la. *Retrovirology*, 10(1), 1–1. doi:10.1186/1742-4690-10-69
- McGrath, K. E., Koniski, A. D., Maltby, K. M., McGann, J. K., & Palis, J. (1999). Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Developmental Biology*, 213(2), 442–456. doi:10.1006/dbio.1999.9405
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Debré, P., & Hosmalin, A. (1996). Low infection frequency of macrophages in the spleens of HIV+ patients. *Research in Virology*, 147(2-3), 115–121.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., et al. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *Journal of Virology*, 69(8), 4737–4745.
- Mega, J., Fujihashi, K., Yamamoto, M., McGhee, J. R., Hirasawa, M., & Kiyono, H. (1992). Cytokine production and T cell receptor expression by salivary gland T cells and intraepithelial T lymphocytes for the regulation of the IgA response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 327, 119–131.
- Mehandru, S. (2004). Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Experimental Medicine*, 200(6), 761–770. doi:10.1084/jem.20041196

- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Manuelli, V., Jean-Pierre, P., Lopez, P., et al. (2007). Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 81(2), 599–612. doi:10.1128/JVI.01739-06
- Meng, G., Sellers, M. T., Meg Mosteller-Barnum, Rogers, T. S., Shaw, G. M., & Phillip D Smith. (2000). Lamina Propria Lymphocytes, Not Macrophages, Express CCR5 and CXCR4 and Are the Likely Target Cell for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Intestinal Mucosa. *The Journal of Infectious Diseases*, 1–7.
- Miller, C. J., Alexander, N. J., Sutjipto, S., Lackner, A. A., Gettie, A., Hendrickx, A. G., et al. (1989). Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 63(10), 4277–4284.
- Mizuno, S., Mikami, Y., Kamada, N., Handa, T., Hayashi, A., Sato, T., et al. (2014). Cross-talk Between ROR γ t+ Innate Lymphoid Cells and Intestinal Macrophages Induces Mucosal IL-22 Production in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(8), 1426–1434. doi:10.1097/MIB.0000000000000105
- Monceaux, V., Estaquier, J., Février, M., Cumont, M.-C., Rivière, Y., Aubertin, A.-M., et al. (2003). Extensive apoptosis in lymphoid organs during primary SIV infection predicts rapid progression towards AIDS. *AIDS (London, England)*, 17(11), 1585–1596. doi:10.1097/01.aids.0000076286.54156.d6
- Monceaux, V., Viollet, L., Petit, F., Cumont, M.-C., Kaufmann, G. R., Aubertin, A. M., et al. (2007). CD4+ CCR5+ T-Cell Dynamics during Simian Immunodeficiency Virus Infection of Chinese Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, 81(24), 13865–13875. doi:10.1128/JVI.00452-07
- Monteiro, P., Gosselin, A., Wacleche, V. S., El-Far, M., Said, E. A., Kared, H., et al. (2011). Memory CCR6+CD4+ T Cells Are Preferential Targets for Productive HIV Type 1 Infection Regardless of Their Expression of Integrin α 7. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4618–4630. doi:10.4049/jimmunol.1004151
- Moors, M., Vudattu, N. K., Abel, J., mer, U. K. A., Rane, L., Ulfig, N., et al. (2009). Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes and Immunity*, 11(1), 11–20. doi:10.1038/gene.2009.77
- Morimoto, C., & Schlossman, S. F. (1993). P. Rambotti Lecture. Human naive and memory T cells revisited: new markers (CD31 and CD27) that help define CD4+ T cell subsets. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 11(3), 241–247.
- Mortier, A., Gouwy, M., Van Damme, J., & Proost, P. (2011). Effect of posttranslational processing on the in vitro and in vivo activity of chemokines. *Experimental Cell Research*, 317(5), 642–654. doi:10.1016/j.yexcr.2010.11.016
- Morton, A. M., Sefik, E., Upadhyay, R., Weissleder, R., Benoist, C., & Mathis, D. (2014). Endoscopic photoconversion reveals unexpectedly broad leukocyte trafficking to and from the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(18), 6696–6701. doi:10.1073/pnas.1405634111
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., & Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control☆. *Trends in Immunology*, 25(2), 75–84. doi:10.1016/j.it.2003.12.005
- Mosier, D. E., Picchio, G. R., Gulizia, R. J., Sabbe, R., Poignard, P., Picard, L., et al. (1999). Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *Journal of Virology*, 73(5), 3544–3550.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (2005). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine

- activities and secreted proteins. 1986. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) (Vol. 175, pp. 5–14).
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331–341. doi:10.1038/nri1057
- Nabel, G., & Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326(6114), 711–713. doi:10.1038/326711a0
- Nakano, M., Fujii, T., Hashimoto, M., Yukawa, N., Yoshifuji, H., Ohmura, K., et al. (2012). Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 170(1), 94–100. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04638.x
- Nawaz, F., Cicala, C., Van Ryk, D., Block, K. E., Jelacic, K., McNally, J. P., et al. (2011). The Genotype of Early-Transmitting HIV gp120s Promotes $\alpha 4\beta 7$ –Reactivity, Revealing $\alpha 4\beta 7$ /CD4+ T cells As Key Targets in Mucosal Transmission. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001301. doi:10.1371/journal.ppat.1001301.s005
- Ndolo, T. (1999). Alterations in RANTES Gene Expression and T-Cell Prevalence in Intestinal Mucosa during Pathogenic or Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection, 1–9.
- Neel, C., Etienne, L., Li, Y., Takehisa, J., Rudicell, R. S., Ndong Bass, I., et al. (2010). Molecular Epidemiology of Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Gorillas. *Journal of Virology*, 84(3), 1464–1476. doi:10.1128/JVI.02129-09
- Nicol, A., & Nuovo, G. J. (2005). Detection of HIV-1 provirus and RNA by in situ amplification. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 304, 171–182. doi:10.1385/1-59259-907-9:171
- Niess, J. H. (2005). CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science*, 307(5707), 254–258. doi:10.1126/science.1102901
- Nishimura, Y., Igarashi, T., Donau, O. K., Buckler-White, A., Buckler, C., Lafont, B. A. P., et al. (2004). Highly pathogenic SHIVs and SIVs target different CD4+ T cell subsets in rhesus monkeys, explaining their divergent clinical courses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12324–12329. doi:10.1073/pnas.0404620101
- Nixon, C. C., Vatakis, D. N., Reichelderfer, S. N., Dixit, D., Kim, S. G., Uittenbogaart, C. H., & Zack, J. A. (2013). HIV-1 infection of hematopoietic progenitor cells in vivo in humanized mice. *Blood*, 122(13), 2195–2204. doi:10.1182/blood-2013-04-496950
- Nochi, T., Denton, P. W., Wahl, A., & Garcia, J. V. (2013). Cryptopatches Are Essential for the Development of Human GALT. *Cell Reports*, 3(6), 1874–1884. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.037
- Ogg, G. S. (1998). Quantitation of HIV-1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Plasma Load of Viral RNA. *Science*, 279(5359), 2103–2106. doi:10.1126/science.279.5359.2103
- Okabe, Y., & Medzhitov, R. (2014). Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell*, 157(4), 832–844. doi:10.1016/j.cell.2014.04.016
- Ortiz, A. M., Klatt, N. R., Li, B., Yi, Y., Tabb, B., Hao, X. P., et al. (2011). Depletion of CD4+ T cells abrogates post-peak decline of viremia in SIV-infected rhesus macaques. *Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4433–4445. doi:10.1172/JCI46023DS1
- Otting, N., Vos-Rouweler, A. J. M., Heijmans, C. M. C., Groot, N. G., Doxiadis, G. G. M., & Bontrop, R. E. (2007). MHC class I A region diversity and polymorphism in macaque species. *Immunogenetics*, 59(5), 367–375. doi:10.1007/s00251-007-0201-2
- Pabst, R., Russell, M. W., & Brandtzaeg, P. (2008). Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut. *Trends in Immunology*, 29(5), 206–208.

doi:10.1016/j.it.2008.02.006

- Pabst, R., Schuster, M., & Tschernig, T. (1999). Lymphocyte dynamics in the pulmonary microenvironment: implications for the pathophysiology of pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases : Official Journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*, 16(2), 197–202.
- Paetkau, D., & Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*, 4(4), 519–520.
- Pahar, B., Lackner, A. A., & Veazey, R. S. (2006). Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *European Journal of Immunology*, 36(3), 583–592. doi:10.1002/eji.200535520
- Palframan, R. T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., et al. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(9), 1361–1373.
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S. D., Puel, A., Farr, A. G., et al. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nature Immunology*, 1(1), 59–64. doi:10.1038/76923
- Pandrea, I. V., Gautam, R., Ribeiro, R. M., Brenchley, J. M., Butler, I. F., Pattison, M., et al. (2007). Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(5), 3035–3046.
- Pandrea, I., Apetrei, C., Gordon, S., Barbercheck, J., Dufour, J., Bohm, R., et al. (2006). Paucity of CD4+CCR5+ T cells is a typical feature of natural SIV hosts. *Blood*, 109(3), 1069–1076. doi:10.1182/blood-2006-05-024364
- Pandrea, I., Kornfeld, C., Ploquin, M. J. Y., Apetrei, C., Faye, A., Rouquet, P., et al. (2005). Impact of Viral Factors on Very Early In Vivo Replication Profiles in Simian Immunodeficiency Virus SIVagm-Infected African Green Monkeys. *Journal of Virology*, 79(10), 6249–6259. doi:10.1128/JVI.79.10.6249-6259.2005
- Pandrea, I., Onanga, R., Kornfeld, C., Rouquet, P., Bourry, O., Clifford, S., et al. (2003). High levels of SIVmnd-1 replication in chronically infected Mandrillus sphinx. *Virology*, 317(1), 119–127. doi:10.1016/S0042-6822(03)00628-7
- Pantaleo, G., Demarest, J. F., Schacker, T., Vaccarezza, M., Cohen, O. J., Daucher, M., et al. (1997). The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 254–258.
- Papadakis, K. A., Landers, C., Prehn, J., Kouroumalis, E. A., Moreno, S. T., Gutierrez-Ramos, J. C., et al. (2003). CC Chemokine Receptor 9 Expression Defines a Subset of Peripheral Blood Lymphocytes with Mucosal T Cell Phenotype and Th1 or T-Regulatory 1 Cytokine Profile. *The Journal of Immunology*, 171(1), 159–165. doi:10.4049/jimmunol.171.1.159
- Papadakis, K. A., Prehn, J., Nelson, V., Cheng, L., Binder, S. W., Ponath, P. D., et al. (2000). The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(9), 5069–5076.
- Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J. S., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., & Singer, A. (2004). Suppression of IL7R α Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines. *Immunity*, 21(2), 289–302. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.016
- Park, S. H., Guy-Grand, D., Lemonnier, F. A., Wang, C. R., Bendelac, A., & Jabri, B. (1999). Selection and expansion of CD8 α / α (1) T cell receptor α / β (1) intestinal intraepithelial lymphocytes in the absence of both classical major histocompatibility

- complex class I and nonclassical CD1 molecules. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(6), 885–890.
- Pasternak, A. O., Adema, K. W., Bakker, M., Jurriaans, S., Berkhout, B., Cornelissen, M., & Lukashov, V. V. (2008). Highly Sensitive Methods Based on Seminested Real-Time Reverse Transcription-PCR for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Unspliced and Multiply Spliced RNA and Proviral DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), 2206–2211. doi:10.1128/JCM.00055-08
- Pauza, C. D., Emau, P., Salvato, M. S., Trivedi, P., MacKenzie, D., Malkovsky, M., et al. (1993). Pathogenesis of SIVmac251 after atraumatic inoculation of the rectal mucosa in rhesus monkeys. *Journal of Medical Primatology*, 22(2-3), 154–161.
- Pavli, P., Maxwell, L., Van de Pol, E., & Doe, F. (1996). Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 104(1), 124–132.
- Peeters, M., Honoré, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., et al. (1989). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS (London, England)*, 3(10), 625–630.
- Pene, J., Chevalier, S., Preisser, L., Venereau, E., Guilleux, M. H., Ghannam, S., et al. (2008). Chronically Inflamed Human Tissues Are Infiltrated by Highly Differentiated Th17 Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 180(11), 7423–7430. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7423
- Penedo, M. C. T., Bontrop, R. E., Heijmans, C. M. C., Otting, N., Noort, R., Rouweler, A. J. M., et al. (2005). Microsatellite typing of the rhesus macaque MHC region. *Immunogenetics*, 57(3-4), 198–209. doi:10.1007/s00251-005-0787-1
- Perrin, L. (1999). Primary HIV infection. *Antiviral Therapy*, 4 Suppl 3, 13–18.
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(5), 1955–1960.
- Phair, J. P. (1994). Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(8), 883–885.
- Picker, L. J., Terstappen, L. W., Rott, L. S., Streeter, P. R., Stein, H., & Butcher, E. C. (1990). Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(10), 3247–3255.
- Pilling, D., Fan, T., Huang, D., Kaul, B., & Gomer, R. H. (2009). Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts. *PLoS ONE*, 4(10), e7475. doi:10.1371/journal.pone.0007475.t001
- Pitcher, C. J., Hagen, S. I., Walker, J. M., Lum, R., Mitchell, B. L., Maino, V. C., et al. (2002). Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(1), 29–43.
- Pitcher, C. J., Quittner, C., Peterson, D. M., Connors, M., Koup, R. A., Maino, V. C., & Picker, L. J. (1999). HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nature Medicine*, 5(5), 518–525. doi:10.1038/8400
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Publishing Group*, 1–2. doi:10.1038/nm.2016
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., & Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), 7415–7419.
- Poles, M. A., Elliott, J., Taing, P., Anton, P. A., & Chen, I. S. Y. (2001). A Preponderance of

- CCR5+ CXCR4+ Mononuclear Cells Enhances Gastrointestinal Mucosal Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, 75(18), 8390–8399. doi:10.1128/JVI.75.18.8390-8399.2001
- Pope, M., & Haase, A. T. (2003). Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nature Medicine*, 9(7), 847–852. doi:10.1038/nm0703-847
- Preza, G. C., Tanner, K., Elliott, J., Yang, O. O., Anton, P. A., & Ochoa, M.-T. (2014). Antigen-Presenting Cell Candidates for HIV-1 Transmission in Human Distal Colonic Mucosa Defined by CD207 Dendritic Cells and CD209 Macrophages. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 30(3), 241–249. doi:10.1089/aid.2013.0145
- Princen, K., Hatse, S., Vermeire, K., Aquaro, S., De Clercq, E., Gerlach, L. O., et al. (2004). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Replication by a Dual CCR5/CXCR4 Antagonist. *Journal of Virology*, 78(23), 12996–13006. doi:10.1128/JVI.78.23.12996-13006.2004
- Proost, P., De Meester, I., Schols, D., Struyf, S., Lambeir, A. M., Wuyts, A., et al. (1998). Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7222–7227.
- Proost, P., Loos, T., Mortier, A., Schutyser, E., Gouwy, M., Noppen, S., et al. (2008). Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 2085–2097. doi:10.1084/jem.20080305
- Prost, S., Le Dantec, M., Augé, S., Le Grand, R., Derdouch, S., Auregan, G., et al. (2008). Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPAR γ /STAT5 signaling pathway in macaques. *Journal of Clinical Investigation*. doi:10.1172/JCI33037
- Proudfoot, A. E. I., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., et al. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1885–1890. doi:10.1073/pnas.0334864100
- Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., et al. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nature Immunology*, 10(1), 101–108. doi:10.1038/ni.1675
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., et al. (2011). Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Humans with Inborn Errors of Interleukin-17 Immunity. *Science*, 332(6025), 65–68. doi:10.1126/science.1200439
- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., & Stappenbeck, T. S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), 99–104. doi:10.1073/pnas.0405979102
- Raffatellu, M., Santos, R. L., Verhoeven, D. E., George, M. D., Wilson, R. P., Winter, S. E., et al. (2008). Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. *Nature Medicine*, 14(4), 421–428. doi:10.1038/nm1743
- Rancez, M., Couëdel-Courteille, A., & Cheynier, R. (2012). Chemokines at mucosal barriers and their impact on HIV infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 23(4-5), 233–243. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.05.010
- Reinecker, H. C., & Podolsky, D. K. (1995). Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), 8353–8357.

- Reinhart, T. A. (2003). Chemokine induction by HIV-1: recruitment to the cause. *Trends in Immunology*, 24(7), 351–353. doi:10.1016/S1471-4906(03)00163-7
- Ribeiro dos Santos, P., Rancez, M., Pr  tet, J. L., Michel-Salzat, A., Messent, V., Bogdanova, A., et al. (2011). Rapid Dissemination of SIV Follows Multisite Entry after Rectal Inoculation. *PLoS ONE*, 6(5), e19493. doi:10.1371/journal.pone.0019493.s007
- Rochman, Y., Spolski, R., & Leonard, W. J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature Reviews Immunology*, 9(7), 480–490. doi:10.1038/nri2580
- Rodgers, V. D., Fassett, R., & Kagnoff, M. F. (1986). Abnormalities in intestinal mucosal T cells in homosexual populations including those with the lymphadenopathy syndrome and acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*, 90(3), 552–558.
- ROE, M. F. E., BLOXHAM, D. M., WHITE, D. K., ROSS-RUSSELL, R. I., TASKER, R. T. C., & O'DONNELL, D. R. (2004). Lymphocyte apoptosis in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 137(1), 139–145. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02512.x
- Rogler, G., Hausmann, M., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Andus, T., Falk, W., et al. (1998). Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 112(2), 205–215.
- Rot, A. (2005). Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(6), 687–694. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.05.011
- Rowland-Jones, A. J. M. S. L. (2001). Cellular immune responses to HIV, 1–8.
- Rugtveit, J., Bakka, A., & Brandtzaeg, P. (1997a). Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology*, 110(1), 104–113.
- Rugtveit, J., Nilsen, E. M., Bakka, A., Carlsen, H., Brandtzaeg, P., & Scott, H. (1997b). Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 112(5), 1493–1505.
- Ruiz, P., Wiles, M. V., & Imhof, B. A. (1995). Alpha 6 integrins participate in pro-T cell homing to the thymus. *European Journal of Immunology*, 25(7), 2034–2041. doi:10.1002/eji.1830250735
- Rutjens, E., Balla-Jhagjhoorsingh, S., Verschoor, E., Bogers, W., Koopman, G., & Heeney, J. (2003). Lentivirus infections and mechanisms of disease resistance in chimpanzees. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library*, 8, d1134–45.
- Rychert, J., Lacour, N., & Amedee, A. M. (2006). Genetic Analysis of Simian Immunodeficiency Virus Expressed in Milk and Selectively Transmitted through Breastfeeding. *Journal of Virology*, 80(8), 3721–3731. doi:10.1128/JVI.80.8.3721-3731.2006
- Sabin, C. A., & Lundgren, J. D. (2013). The natural history of HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 1. doi:10.1097/COH.0b013e328361fa66
- Sadir, R., Imbert, A., Baleux, F., & Lortat-Jacob, H. (2004). Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43854–43860. doi:10.1074/jbc.M405392200
- Saidi, H., Magri, G., Carbonneil, C., Nasreddine, N., Requena, M., & Belec, L. (2006). IFN- γ -activated monocytes weakly produce HIV-1 but induce the recruitment of HIV-sensitive T cells and enhance the viral production by these recruited T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3), 642–653. doi:10.1189/jlb.0406278
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*,

- 401(6754), 708–712. doi:10.1038/44385
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., & Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(6), 875–883.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593), 722–725. doi:10.1038/382722a0
- Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Bailes, E., Kamenya, S., Muller, M. N., Lukasik, M., et al. (2003). Amplification of a Complete Simian Immunodeficiency Virus Genome from Fecal RNA of a Wild Chimpanzee. *Journal of Virology*, 77(3), 2233–2242. doi:10.1128/JVI.77.3.2233-2242.2003
- Sarris, M., Masson, J.-B., Maurin, D., Van der Aa, L. M., Boudinot, P., Lortat-Jacob, H., & Herbomel, P. (2012). Inflammatory Chemokines Direct and Restrict Leukocyte Migration within Live Tissues as Glycan-Bound Gradients. *Current Biology*, 22(24), 2375–2382. doi:10.1016/j.cub.2012.11.018
- Sasseville, V. G., Du, Z., Chalifoux, L. V., Pauley, D. R., Young, H. L., Sehgal, P. K., et al. (1996). Induction of lymphocyte proliferation and severe gastrointestinal disease in macaques by a nef gene variant SIVmac239. *The American Journal of Pathology*, 149(1), 163–176.
- Sasson, S. C., Zaunders, J. J., Zanetti, G., King, E. M., Merlin, K. M., Smith, D. E., et al. (2006). Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(4), 505–514. doi:10.1086/499309
- Sawa, Y., & Tsuruga, E. (2008). The expression of E-selectin and chemokines in the cultured human lymphatic endothelium with lipopolysaccharides. *Journal of Anatomy*, 212(5), 654–663. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00892.x
- Schatz, D. G. (2004). V(D)J recombination. *Immunological Reviews*, 200, 5–11. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00173.x
- Schieferdecker, H. L., Ullrich, R., Weiss-Breckwoldt, A. N., Schwarting, R., Stein, H., Riecken, E. O., & Zeitz, M. (1990). The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144(7), 2541–2549.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., & Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology*, 1(5), 426–432. doi:10.1038/80868
- Schmitz, J. E. (1999). Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8+ Lymphocytes. *Science*, 283(5403), 857–860. doi:10.1126/science.283.5403.857
- Schmutz, C., Cartwright, A., Williams, H., Haworth, O., Williams, J. H. H., Filer, A., et al. (2010). Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 12(4), R161. doi:10.1186/ar3120
- Schneider, T., Jahn, H. U., Schmidt, W., Riecken, E. O., Zeitz, M., & Ullrich, R. (1995). Loss of CD4 T lymphocytes in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 is more pronounced in the duodenal mucosa than in the peripheral blood. Berlin Diarrhea/Wasting Syndrome Study Group. *Gut*, 37(4), 524–529.
- Schnittman, S. M., Lane, H. C., Greenhouse, J., Justement, J. S., Baseler, M., & Fauci, A. S. (1990). Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6058–6062.
- Schols, D., & De Clercq, E. (1998). The simian immunodeficiency virus mnd(GB-1) strain

- uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 9), 2203–2205.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N. A., Dercksen, M. W., De Goede, R. E., van Steenwijk, R. P., et al. (1992). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *Journal of Virology*, 66(3), 1354–1360.
- Schultheiss, T., & Stahl-Hennig, C. (2011). Correlation between CD4+ T-cell loss and Gag-specific T cells in different intestinal sites of chronically SIV-infected rhesus monkeys. *AIDS (London, England)*, 25(4), 429–433. doi:10.1097/QAD.0b013e3283430034
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E. K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W. W., & Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3101–3114. doi:10.1002/eji.200636426
- Schwarz, B. A., Sambandam, A., Maillard, I., Harman, B. C., Love, P. E., & Bhandoola, A. (2007). Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(4), 2008–2017.
- Schweighoffer, T., Tanaka, Y., Tidswell, M., Erle, D. J., Horgan, K. J., Luce, G. E., et al. (1993). Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-trophism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(2), 717–729.
- Sereti, I., Dunham, R. M., Spritzler, J., Aga, E., Proschan, M. A., Medvik, K., et al. (2009). IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood*, 113(25), 6304–6314. doi:10.1182/blood-2008-10-186601
- Sereti, I., Estes, J. D., Thompson, W. L., Morcock, D. R., Fischl, M. A., Croughs, T., et al. (2014). Decreases in Colonic and Systemic Inflammation in Chronic HIV Infection after IL-7 Administration. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003890. doi:10.1371/journal.ppat.1003890.s008
- Shen, R., Meng, G., Ochsenbauer, C., Clapham, P. R., Grams, J., Novak, L., et al. (2011). Stromal Down-Regulation of Macrophage CD4/CCR5 Expression and NF- κ B Activation Mediates HIV-1 Non-Permissiveness in Intestinal Macrophages. *PLoS Pathogens*, 7(5), e1002060. doi:10.1371/journal.ppat.1002060.t001
- Sheppard, H. W., Ascher, M. S., Winkelstein, W., Vittinghoff, E., Osmond, D., Moss, A. R., & Shiboski, S. (1993). Use of T lymphocyte subset analysis in the case definition for AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 6(3), 287–294.
- Shitara, S., Hara, T., Liang, B., Wagatsuma, K., Zuklys, S., Hollander, G. A., et al. (2013). IL-7 Produced by Thymic Epithelial Cells Plays a Major Role in the Development of Thymocytes and TCR + Intraepithelial Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 190(12), 6173–6179. doi:10.4049/jimmunol.1202573
- Shulman, Z., Cohen, S. J., Roediger, B., Kalchenko, V., Jain, R., Grabovsky, V., et al. (2011). Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots. *Nature Immunology*, 13(1), 67–76. doi:10.1038/ni.2173
- Sieweke, M. H., & Allen, J. E. (2013). Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science*, 342(6161), 1242974–1242974. doi:10.1126/science.1242974
- Silva-Santos, B., Pennington, D. J., & Hayday, A. C. (2005). Lymphotoxin-mediated regulation of gammadelta cell differentiation by alphabeta T cell progenitors. *Science*, 307(5711), 925–928. doi:10.1126/science.1103978
- Silvestri, G. (2009). Immunity in natural SIV infections. *Journal of Internal Medicine*, 265(1), 97–109. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02049.x

- Simonetta, F., Gestermann, N., Martinet, K. Z., Boniotto, M., Tissi res, P., Seddon, B., & Bourgeois, C. (2012). Interleukin-7 Influences FOXP3+CD4+ Regulatory T Cells Peripheral Homeostasis. *PLoS ONE*, 7(5), e36596. doi:10.1371/journal.pone.0036596.g005
- Singer, A. (2002). New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Current Opinion in Immunology*, 14(2), 207–215.
- Singh, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Hedrick, M. N., & Farber, J. M. (2008). Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(1), 214–221.
- Smit-McBride, Z., Mattapallil, J. J., McChesney, M., Ferrick, D., & Dandekar, S. (1998). Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *Journal of Virology*, 72(8), 6646–6656.
- Smith, D. G., & McDonough, J. (2005). Mitochondrial DNA variation in Chinese and Indian rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*, 65(1), 1–25. doi:10.1002/ajp.20094
- Smith, S. M., Holland, B., Russo, C., Dailey, P. J., Marx, P. A., & Connor, R. I. (1999). Retrospective analysis of viral load and SIV antibody responses in rhesus macaques infected with pathogenic SIV: predictive value for disease progression. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 15(18), 1691–1701. doi:10.1089/088922299309739
- Smythies, L. E. (2006). Mucosal IL-8 and TGF- recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3), 492–499. doi:10.1189/jlb.1005566
- Smythies, L. E., Sellers, M., Clements, R. H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W. H., et al. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 66–75. doi:10.1172/JCI200519229
- Sodora, D. L., Gettie, A., Miller, C. J., & Marx, P. A. (1998a). Vaginal transmission of SIV: assessing infectivity and hormonal influences in macaques inoculated with cell-free and cell-associated viral stocks. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14 Suppl 1, S119–23.
- Sodora, D. L., Lee, F., Dailey, P. J., & Marx, P. A. (1998b). A genetic and viral load analysis of the simian immunodeficiency virus during the acute phase in macaques inoculated by the vaginal route. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14(2), 171–181.
- Sportes, C., Hakim, F. T., Memon, S. A., Zhang, H., Chua, K. S., Brown, M. R., et al. (2008). Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1701–1714. doi:10.1016/0198-8859(96)00076-6
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2), 301–314.
- Stagg, A. J., Kamm, M. A., & Knight, S. C. (2002). Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *European Journal of Immunology*, 32(5), 1445–1454. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1445::AID-IMMU1445>3.0.CO;2-E
- Staples, E., Ingram, R. J. M., Atherton, J. C., & Robinson, K. (2013). Optimising the quantification of cytokines present at low concentrations in small human mucosal tissue samples using Luminex assays. *Journal of Immunological Methods*, 394(1-2), 1–9. doi:10.1016/j.jim.2013.04.009
- Staton, T. L., Habtezion, A., Winslow, M. M., Sato, T., Love, P. E., & BUTCHER, E. C. (2006). CD8+ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small

- intestine epithelium. *Nature Immunology*, 7(5), 482–488. doi:10.1038/ni1319
- Steeber, D. A., & Tedder, T. F. (2000). Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunologic Research*, 22(2-3), 299–317. doi:10.1385/IR:22:2-3:299
- Steen, A. M., Luthman, H., Hellgren, D., & Lambert, B. (1990). Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Experimental Cell Research*, 186(2), 236–244.
- Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., & Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1775–1785. doi:10.1084/jem.188.2.287
- Suzuki, G., Nakata, Y., Dan, Y., Uzawa, A., Nakagawa, K., Saito, T., et al. (1998). Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *International Immunology*, 10(8), 1049–1056.
- Swainson, L., Kinet, S., Mongellaz, C., Sourisseau, M., Henriques, T., & Taylor, N. (2006). IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood*, 109(3), 1034–1042. doi:10.1182/blood-2006-06-027912
- Takehisa, J., Kraus, M. H., Ayoub, A., Bailes, E., Van Heuverswyn, F., Decker, J. M., et al. (2009). Origin and Biology of Simian Immunodeficiency Virus in Wild-Living Western Gorillas. *Journal of Virology*, 83(4), 1635–1648. doi:10.1128/JVI.02311-08
- Takeya, M., Tsuchiya, T., Shimokawa, Y., & Takahashi, K. (1991). A new monoclonal antibody, PM-2K, specifically recognizes tissue macrophages but not blood monocytes. *The Journal of Pathology*, 163(4), 315–321. doi:10.1002/path.1711630408
- Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., & Surh, C. D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8732–8737. doi:10.1073/pnas.161126098
- Tarling, J. D., Lin, H. S., & Hsu, S. (1987). Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *Journal of Leukocyte Biology*, 42(5), 443–446.
- Thiebot, H., Vaslin, B., Derdouch, S., Bertho, J.-M., Mouthon, F., Prost, S., et al. (2005). Impact of bone marrow hematopoiesis failure on T-cell generation during pathogenic simian immunodeficiency virus infection in macaques. *Blood*, 105(6), 2403–2409. doi:10.1182/blood-2004-01-0025
- Toure, I. D., Nkurunziza, T., Sagoe-Moses, C., G, C., & T, K. (2013). Prévention de la transmission mère-enfant du VIH/SIDA en Afrique Sub-saharienne. *African Health Monitor*.
- Tourigny, M. R., Mazel, S., Burtrum, D. B., & Petrie, H. T. (1997). T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(9), 1549–1556.
- Trepel, F. (1974). Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift*, 52(11), 511–515.
- Trichel, A. M., Rajakumar, P. A., & Murphey-Corb, M. (2002). Species-specific variation in SIV disease progression between Chinese and Indian subspecies of rhesus macaque. *Journal of Medical Primatology*, 31(4-5), 171–178.
- Turville, S. G. (2001). HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood*, 98(8), 2482–2488. doi:10.1182/blood.V98.8.2482
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H. D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., et al. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal*

- of *Experimental Medicine*, 200(4), 493–505. doi:10.1084/jem.20040643
- Ullrich, R., Zeitz, M., Heise, W., L'age, M., Ziegler, K., Bergs, C., & Riecken, E. O. (1990). Mucosal atrophy is associated with loss of activated T cells in the duodenal mucosa of human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. *Digestion*, 46 Suppl 2, 302–307.
- Ulvmar, M. H., Werth, K., Braun, A., Kelay, P., Hub, E., Eller, K., et al. (2014). The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. *Nature Immunology*, 15(7), 623–630. doi:10.1038/ni.2889
- Valentin, A., Rosati, M., Patenaude, D. J., Hatzakis, A., Kostrikis, L. G., Lazanas, M., et al. (2002). Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7015–7020. doi:10.1073/pnas.102672999
- van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 128(3), 415–435.
- van Noesel, C. J., Gruters, R. A., Terpstra, F. G., Schellekens, P. T., van Lier, R. A., & Miedema, F. (1990). Functional and phenotypic evidence for a selective loss of memory T cells in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected men. *Journal of Clinical Investigation*, 86(1), 293–299. doi:10.1172/JCI114698
- Vanhems, P., Hirschel, B., Phillips, A. N., Cooper, D. A., Vizzard, J., Brassard, J., & Perrin, L. (2000). Incubation time of acute human immunodeficiency virus (HIV) infection and duration of acute HIV infection are independent prognostic factors of progression to AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(1), 334–337. doi:10.1086/315687
- Veazey, R. S. (1998). Gastrointestinal Tract as a Major Site of CD4+ T Cell Depletion and Viral Replication in SIV Infection. *Science*, 280(5362), 427–431. doi:10.1126/science.280.5362.427
- Veazey, R. S., Mansfield, K. G., Tham, I. C., Carville, A. C., Shvetz, D. E., Forand, A. E., & Lackner, A. A. (2000). Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*, 74(23), 11001–11007.
- Veazey, R. S., Rosenzweig, M., Shvetz, D. E., Pauley, D. R., DeMaria, M., Chalifoux, L. V., et al. (1997). Characterization of gut-associated lymphoid tissue (GALT) of normal rhesus macaques. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 82(3), 230–242.
- Verhoeven, D., George, M. D., Hu, W., Dang, A. T., Smit-McBride, Z., Reay, E., et al. (2014). Enhanced innate antiviral gene expression, IFN- α , and cytolytic responses are predictive of mucosal immune recovery during simian immunodeficiency virus infection. *The Journal of Immunology*, 192(7), 3308–3318. doi:10.4049/jimmunol.1302415
- Viollet, L., Monceaux, V., Petit, F., Fang, R. H. T., Cumont, M.-C., Hurtrel, B., & Estaquier, J. (2006). Death of CD4+ T Cells from Lymph Nodes during Primary SIVmac251 Infection Predicts the Rate of AIDS Progression. *The Journal of Immunology*, 177(10), 6685–6694. doi:10.4049/jimmunol.177.10.6685
- Viray, J., Rolfs, B., & Smith, D. G. (2001). Comparison of the frequencies of major histocompatibility (MHC) class-II DQA1 and DQB1 alleles in Indian and Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comparative Medicine*, 51(6), 555–561.
- Wagner, N., Löhler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., et al. (1996). Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature*, 382(6589), 366–370. doi:10.1038/382366a0
- Wang, X., Xu, H., Alvarez, X., Pahar, B., Moroney-Rasmussen, T., Lackner, A. A., & Veazey, R. S. (2011). Distinct Expression Patterns of CD69 in Mucosal and Systemic Lymphoid Tissues in Primary SIV Infection of Rhesus Macaques. *PLoS ONE*, 6(11), e27207. doi:10.1371/journal.pone.0027207.g007
- Warnock, R. A., Campbell, J. J., Dorf, M. E., Matsuzawa, A., McEvoy, L. M., & Butcher, E.

- C. (2000). The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(1), 77–88.
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., et al. (2004). Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 95(6), 2945–2953. doi:10.1172/JCI118002
- Weber, C. (2007). Chemokines take centre stage in vascular biology. *Thrombosis and Haemostasis*. doi:10.1160/TH07-02-0112
- Weber, K. S., Klickstein, L. B., & Weber, C. (1999). Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Molecular Biology of the Cell*, 10(4), 861–873.
- Weissman, D., Barker, T. D., & Fauci, A. S. (1996). The efficiency of acute infection of CD4+ T cells is markedly enhanced in the setting of antigen-specific immune activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(2), 687–692.
- Welsch, S., Keppler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J., & Kräusslich, H.-G. (2007). HIV-1 Buds Predominantly at the Plasma Membrane of Primary Human Macrophages. *PLoS Pathogens*, 3(3), e36. doi:10.1371/journal.ppat.0030036.sg002
- Wiest, R. (n.d.). Bacterial Translocation. *Bioscience Microflora* 2005.
- Wilén, C. B., Wang, J., Tilton, J. C., Miller, J. C., Kim, K. A., Rebar, E. J., et al. (2011). Engineering HIV-Resistant Human CD4+ T Cells with CXCR4-Specific Zinc-Finger Nucleases. *PLoS Pathogens*, 7(4), e1002020. doi:10.1371/journal.ppat.1002020.s005
- Willmann, K., Legler, D. F., Loetscher, M., Roos, R. S., Delgado, M. B., Clark-Lewis, I., et al. (1998). The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *European Journal of Immunology*, 28(6), 2025–2034. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<2025::AID-IMMU2025>3.0.CO;2-C
- Worobey, M., Telfer, P., Souquiere, S., Hunter, M., Coleman, C. A., Metzger, M. J., et al. (2010). Island Biogeography Reveals the Deep History of SIV. *Science*, 329(5998), 1487–1487. doi:10.1126/science.1193550
- Xanthou, G., Duchesnes, C. E., Williams, T. J., & Pease, J. E. (2003). CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *European Journal of Immunology*, 33(8), 2241–2250. doi:10.1002/eji.200323787
- Yellin, M., Paliienko, I., Balanescu, A., Ter-Vartanian, S., Tseluyko, V., Xu, L.-A., et al. (2012). A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy and safety of MDX-1100, a fully human anti-CXCL10 monoclonal antibody, in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(6), 1730–1739. doi:10.1002/art.34330
- Yohn, C. T., Jiang, Z., McGrath, S. D., Hayden, K. E., Khaitovich, P., Johnson, M. E., et al. (2005). Lineage-Specific Expansions of Retroviral Insertions within the Genomes of African Great Apes but Not Humans and Orangutans. *PLoS Biology*, 3(4), e110. doi:10.1371/journal.pbio.0030110.st008
- Younas, M., Hue, S., Lacabartz, C., Guguin, A., Wiedemann, A., Surenaud, M., et al. (2013). IL-7 Modulates In Vitro and In Vivo Human Memory T Regulatory Cell Functions through the CD39/ATP Axis. *The Journal of Immunology*, 191(6), 3161–3168. doi:10.4049/jimmunol.1203547
- Yukl, S. A., Gianella, S., Sinclair, E., Epling, L., Li, Q., Duan, L., et al. (2010). Differences in HIV Burden and Immune Activation within the Gut of HIV-Positive Patients Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *Journal of Infectious Diseases*, 202(10), 1553–1561.

doi:10.1086/656722

- Zaitseva, M. B., Lee, S., Rabin, R. L., Tiffany, H. L., Farber, J. M., Peden, K. W., et al. (1998). CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(6), 3103–3113.
- Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P., & Hidalgo, A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 118(26), 6743–6751. doi:10.1182/blood-2011-07-343566
- Zhang, L., Ramratnam, B., Tenner-Racz, K., He, Y., Vesanen, M., Lewin, S., et al. (1999). Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *The New England Journal of Medicine*, 340(21), 1605–1613. doi:10.1056/NEJM199905273402101
- Zhou, Y., Bao, R., Haigwood, N. L., Persidsky, Y., & Ho, W.-Z. (2013). SIV infection of rhesus macaques of Chinese origin: a suitable model for HIV infection in humans. *Retrovirology*, 10(1), 1–1. doi:10.1186/1742-4690-10-89
- Zhou, Z., Barry de Longchamps, N., Schmitt, A., Zerbib, M., Vacher-Lavenu, M.-C., Bomsel, M., & Ganor, Y. (2011). HIV-1 Efficient Entry in Inner Foreskin Is Mediated by Elevated CCL5/RANTES that Recruits T Cells and Fuels Conjugate Formation with Langerhans Cells. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002100. doi:10.1371/journal.ppat.1002100.g007
- Zigmond, E., & Jung, S. (2013). Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends in Immunology*, 34(4), 162–168. doi:10.1016/j.it.2013.02.001
- Zimmer, M. I. (2002). Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. *Blood*, 99(8), 2859–2868. doi:10.1182/blood.V99.8.2859
- Zimmerman, P. A., Buckler-White, A., Alkhatib, G., Spalding, T., Kubofcik, J., Combadiere, C., et al. (1997). Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 3(1), 23–36.
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121–127.
- Zlotoff, D. A., Sambandam, A., Logan, T. D., Bell, J. J., Schwarz, B. A., & Bhandoola, A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*, 115(10), 1897–1905. doi:10.1182/blood-2009-08-237784